

**U. PORTO**



**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**UNIVERSIDADE DO PORTO**

Mestrado em Controlo de Qualidade

**Estudo comparativo da fracção proteica de  
maltes, mostos e cervejas provenientes das  
variedades de cevada Scarlett e Prestige**

José Filipe Campos da Silva

Porto

2005

**U. PORTO**



**FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO**

**Estudo comparativo da fracção proteica de  
maltes, mostos e cervejas provenientes das  
variedades de cevada Scarlett e Prestige**

**José Filipe Campos da Silva**

FACULDADE DE FARMÁCIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 30/01/2006
Reg. 3315
Cota

FFM  
SIL  
3315

**Orientadora:**

Professora Doutora Natércia Aurora Almeida Teixeira

**Co-orientadora:**

Professora Doutora Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira

Julho de 2005



DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE  
DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO  
PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
CONTROLO DE QUALIDADE.

---

## Publicações e comunicações

Da realização deste trabalho resultaram as seguintes publicações e comunicações:

### Publicações

- Luciana C. Nogueira, **Filipe Silva**, Isabel M.P.L.V.O. Ferreira, L.C. Trugo, (2005), "Separation and quantification of beer carbohydrates by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection", *Journal of Chromatography A*, 1065:2, pp. 207-210.
- **Filipe Silva**, Isabel M.P.L.V.O. Ferreira, Natércia Teixeira, "Constituintes da cerveja que influenciam a qualidade da sua espuma", *Boletim de Biotecnologia* (aceite para publicação em Fevereiro de 2005).
- Isabel M.P.L.V.O. Ferreira, Kátia Jorge, Luciana C. Nogueira, **Filipe Silva**, Luiz C. Trugo, (2005), "Effects of the combination of hydrophobic polypeptides, iso- $\alpha$ -acids, and malto-oligosaccharides on beer foam stability", *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, pp. 4976-4981.
- **Filipe Silva**, Isabel M.P.L.V.O. Ferreira, Natércia Teixeira, "Polipeptídeos e proteínas com influência na qualidade da espuma da cerveja e métodos analíticos utilizados no seu estudo" (submetido para publicação).
- **Filipe Silva**, Luciana C. Nogueira, Isabel M.P.L.V.O. Ferreira, Natércia Teixeira, "Comparative study of the protein fraction of malts, worts and beers produced from Scarlett and Prestige barley varieties" (em elaboração).

---

## Comunicações

- Luciana C. Nogueira, **Filipe Silva**, Isabel M.P.L.V.O. Ferreira, L.C. Trugo, "Determination of carbohydrates in beer by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection", Tenth Latin American Congress on Chromatography and related techniques – COLACRO X, Arts & Convention Center, Campos do Jordão, Brasil, 18-22 de Outubro de 2004 (comunicação em painel).
- L.H.M.L.M. Santos, M.F Martins, **F. Silva**, N. Teixeira, I.M.P.L.V.O. Ferreira, "Influência da fracção proteica, hidratos de carbono e ácidos orgânicos na estabilidade da espuma da cerveja", Sessão pública de apresentação dos projectos de investigação científica na pré-graduação, Reitoria da Universidade do Porto, 15 de Dezembro de 2004 (comunicação em painel).
- **Filipe Silva**, Isabel M.P.L.V.O. Ferreira, Natércia Teixeira, "Caracterização da fracção proteica do malte por SDS-PAGE e RP-HPLC/UV", Livro de resumos e CD-ROM do 7º Encontro de Química dos Alimentos, ESAV – IPV, Viseu, 13-16 de Abril de 2005 (comunicação oral).
- M.F. Martins, L.H.M.L.M. Santos, L.C. Nogueira, **F. Silva**, O. Pinho, I.M.P.L.V.O. Ferreira, L.C. Trugo, "Separação de Proteínas, malto-oligossacarídeos e iso- $\alpha$ -ácidos da cerveja", Livro de resumos e CD-ROM do 7º Encontro de Química dos Alimentos, ESAV – IPV, Viseu, 13-16 de Abril de 2005 (comunicação em painel).
- Nogueira, L.C., **Silva, J.F.C.**, Ferreira, I.M.P.L.V.O., Trugo, L.C., "Caracterização de cervejas com e sem álcool em relação aos indicadores de qualidade e suas características reológicas", 6º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, Brasil, 7-11 de Novembro de 2005 (submetido).

- 
- **Silva, J.F.C.,** Nogueira, L.C., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Teixeira, N.,  
“Comparação dos perfis cromatográficos e electroforéticos das albuminas de  
maltes das variedades Scarlett e Prestige”, 6º Simpósio Latino Americano de  
Ciência de Alimentos, Campinas, Brasil, 7-11 de Novembro de 2005  
(submetido).



---

## Agradecimentos

- À Professora Doutora Natércia Teixeira, minha orientadora, pela disponibilidade e simpatia, pelas suas sugestões e pelo apoio, interesse e rigor científico sempre demonstrados.
- À Professora Doutora Isabel Ferreira, minha co-orientadora, pela disponibilidade e simpatia, pelo incentivo e pelo empenho e rigor demonstrados.
- Ao Professor Doutor Félix Carvalho, coordenador do curso de Mestrado em Controlo de Qualidade, pela disponibilidade e pelo apoio prestado ao longo do período em que decorreu este mestrado.
- Aos Laboratórios de Bioquímica e de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pelo acolhimento, pela simpatia e pelas condições disponibilizadas para a realização deste trabalho.
- À empresa cervejeira UNICER – Bebidas de Portugal SGPS, SA, Leça do Balio, pelo acolhimento, pelas condições disponibilizadas e pela oportunidade concedida para a realização do estágio no departamento de Qualidade, Investigação e Desenvolvimento.
- À Dr.<sup>a</sup> Cristina Gonçalves, Assessora Técnica da DQID da UNICER SGPS, pela simpatia e pelo interesse demonstrados, assim como pelos esclarecimentos prestados.
- Ao Dr. António Augusto Ferreira, Director da DQID da UNICER SGPS, pelas sugestões e pelo acolhimento no departamento de Qualidade, Investigação e Desenvolvimento da UNICER.

---

## Abreviaturas

- 2D-PAGE – Electroforese bidimensional
- ACP – Análise de Componentes Principais
- APS – Persulfato de amónio
- BIS – N, N'-metilenobisacrilamida
- BSA – Albumina de soro bovino
- CER – Cerveja cheia
- CV – Coeficiente de Variação
- DTT – Ditioneitol
- EBC – “European Brewery Convention”
- ELISA – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
- EP – Endoprotease
- EXTHO – Albuminas extraídas segundo o método de Howard *et al.* (1996)
- fLTP1 – “foam Lipid Transfer Protein 1”
- fLTP – “foam Lipid Transfer Protein”
- HIC – Cromatografia de Interações Hidrofóbicas
- HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Resolução
- IEF – Focagem Isoelétrica
- kDa – Kilodalton
- KMO – Kaiser-Meyer-Olkin
- LBPs – “Lipid-Binding Proteins”
- LTP1 – “Lipid Transfer Protein 1”
- LTP – “Lipid Transfer Protein”
- MFRPR – Mosto frio Prestige
- MFRSC – Mosto frio Scarlett
- nsLTP – “non-specific Lipid Transfer Protein”
- PAPI – “Probable Amylase/Protease Inhibitor”
- PGA – Alginato de Propilenoglicol
- PR – Prestige
- PR60H – Malte Prestige com 60 horas de germinação
- PR120H – Malte Prestige com 120 horas de germinação



- 
- RP-HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Resolução em Fase Reversa
  - SC – Scarlett
  - SC60H – Malte Scarlett com 60 horas de germinação
  - SC120H – Malte Scarlett com 120 horas de germinação
  - SDS – Dodecilsulfato de Sódio
  - SDS-PAGE – Electroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de Sódio
  - TCF – Cerveja filtrada
  - TEMED – N,N,N',N'-tetrametilenodiamina
  - TFA – Ácido Trifluoracético
  - Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

---

## Resumo

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo. É produzida, essencialmente, a partir de malte, água, lúpulo e leveduras. O seu fabrico é precedido por um processo designado por maltagem, onde os grãos de cevada são transformados em malte. As cevadas (*Hordeum vulgare* L.) Scarlett e Prestige são variedades de primavera, de duas fileiras, com boas características agrícolas. A variedade Scarlett apresenta muito boa qualidade cervejeira e é considerada uma variedade padrão, pela "European Brewery Convention" (EBC), para a região sul da Europa. Por sua vez, a variedade Prestige, com o processo de aprovação tecnológica actualmente concluído, foi introduzida em Portugal em 2003. O seu desenvolvimento no nosso país é muito promissor, sendo esperada a sua aplicação como malte de utilização geral.

Neste trabalho, foram estudados maltes, produzidos a partir das duas variedades de cevada referidas (colhidas no Alentejo em 2003), utilizando o mesmo diagrama de maltagem. Recolheram-se amostras, de cada uma das variedades, com 60 e 120 horas de germinação. A partir dos maltes obtidos produziram-se cervejas (fabricos monomálticos), utilizando os mesmos métodos de brassagem, de fermentação (com leveduras da mesma geração) e de filtração, assim como iguais condições de enchimento da cerveja (mesma linha de enchimento e mesma embalagem final). Foram recolhidas amostras de mosto frio e de cerveja, tanto do tanque de cerveja filtrada, como de cerveja cheia.

As amostras de malte foram submetidas a três métodos de extracção de proteínas, um específico para hordeínas (baseado no procedimento de Schmitt *et al.* (1989)) e os outros dois específicos para albuminas e outras proteínas solúveis (baseados nos procedimentos de Kapp e Bamforth (2002) e de Howard *et al.* (1996)).

Este trabalho teve como objectivo realizar um estudo comparativo dos perfis cromatográficos, obtidos por cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa, e electroforéticos, obtidos por electroforese em gel de



---

poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio, das proteínas dos maltes, das duas variedades de cevada nacional, e dos respectivos mostos e cervejas. Durante o processo de separação das albuminas e outras proteínas solúveis dos maltes, por cromatografia, recolheram-se fracções proteicas, que foram posteriormente analisadas pelo método electroforético. Os dados resultantes das separações cromatográficas, das proteínas existentes nas diferentes amostras, foram analisados pelo método estatístico de Análise de Componentes Principais (ACP). O objectivo deste procedimento foi simplificar os resultados obtidos, tornando-os mais facilmente interpretáveis, e agrupar, ou separar, as amostras de acordo com o seu maior ou menor conteúdo em proteínas, existentes nos diferentes picos. As amostras utilizadas neste trabalho foram ainda sujeitas a diversas análises físico-químicas, realizadas nos laboratórios das empresas MALTIBÉRICA, SA, Poceirão e UNICER – Bebidas de Portugal SGPS, SA, Leça do Balio.

A partir dos dados obtidos com as separações cromatográfica e electroforética verificou-se que, de uma forma geral, as amostras provenientes da variedade Scarlett continham maiores quantidades de proteína do que as provenientes da variedade Prestige. Relativamente às amostras de malte, ao longo da germinação houve diminuição do conteúdo em hordeínas e aumento do conteúdo em albuminas e outras proteínas solúveis. No que diz respeito às análises físico-químicas, realizadas nas amostras utilizadas neste trabalho, verificou-se, ainda, que os parâmetros se encontravam dentro das especificações. O valor da estabilidade da espuma, no entanto, sendo normal no caso das cervejas Scarlett, podia ser considerado baixo para as cervejas Prestige. Embora se tenha observado, pelo método estatístico de ACP, que quer os maltes, quer os mostos, provenientes das Variedades Scarlett e Prestige, apresentavam diferenças significativas entre si, as cervejas finais não eram significativamente diferentes. Pode-se assim concluir que quer a variedade Scarlett, quer a Prestige, podem ser utilizadas para produzir cervejas com características semelhantes.

---

## Abstract

Beer is the world's most consumed alcoholic beverage. It is produced, essentially, from malt, water, hops and yeast. A process known as malting, by which barley grains are transformed into malt, precedes its production.

Scarlett and Prestige barleys (*Hordeum vulgare* L.) are two rowed spring varieties, with good agronomic characteristics. Scarlett variety has a very good brewing quality and is considered a standard variety, by European Brewery Convention (EBC), for southern Europe. On the other hand, Prestige variety, with its technological approving process currently concluded, was introduced in Portugal in the year 2003. Its development in our country is very promising, being expected its application as a general use malt.

In this work, malts produced from the two barley varieties (cultivated in Alentejo), using the same malting diagram, were studied. Samples were collected, from the two varieties, with 60 and 120 hours of germination. With these malts, beers were produced, using the same mashing, fermentation and filtration processes, as well as the same beer filling process. Wort and beer samples were also collected.

The malt samples were subjected to three protein extraction processes, one hordein-specific (based on the Schmitt *et al.* (1989) method) and two albumin-specific (based on the Kapp and Bradford (2002) and Howard *et al.* (1996) methods).

The aim of this work was to perform a comparative study of the chromatographic and electrophoretic patterns (obtained by reversed-phase high performance liquid chromatography and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, respectively) of the proteins of the two malt varieties and of the respective worts and beers. During the chromatographic separation of the malt albumins, protein fractions were collected and subsequently analysed by the electrophoretic method. Data obtained from the chromatographic separations of the proteins were analysed by the Principal Component Analysis (PCA) statistical method. The objective of this procedure was to simplify the results, making them more easily interpretable, and unite, or separate, the



---

samples accordingly to their higher or lower protein content, present in the different peaks. All the samples used in this work were submitted to physicochemical analysis, performed in the MALTIBÉRICA, SA, Poceirão and UNICER – Bebidas de Portugal SGPS, SA, Leça do Balio laboratories.

Analysing the data, obtained from the chromatographic and electrophoretic separations, it was verified that the samples produced from the Scarlett barley variety contained a higher protein content, than the samples produced from the Prestige variety. In relation to the malt samples, it was observed that, during germination, a decrease in the hordeins content and an increase in the albumins (and other water-soluble proteins) content has occurred. Analysing the data acquired from the physicochemical analysis, performed on the samples used in this work, it was verified that the evaluated parameters were in agreement with the specifications. The foam stability value, however, considered normal in the Scarlett beers, was low in the Prestige beers. Although, by the PCA statistical method, either the malts or the worts (from the Scarlett and Prestige barley varieties) presented significant differences between the two varieties, in the respective beers no significant differences were verified. It can be concluded that both varieties can be used to produce beers with similar characteristics.

---

# Índice

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1	Cevada e maltagem	2
1.2	A cerveja	5
1.3	Proteínas e polipeptídeos do malte, do mosto e da cerveja	11
1.3.1	<i>Proteína Z</i>	14
1.3.2	<i>LTP1</i>	15
1.3.3	<i>Hordeínas</i>	17
1.3.4	<i>Fragmentos de hordeínas e glutelinas</i>	19
1.3.5	<i>Albuminas</i>	20
1.3.6	<i>Proteases</i>	20
1.3.7	<i>Proteínas provenientes de cereais não maltados</i>	21
1.4	Outros constituintes da cerveja	22
1.5	Relação entre hordeínas e qualidade de maltagem	25
1.6	Métodos analíticos utilizados no estudo das proteínas e dos polipeptídeos do malte, do mosto e da cerveja	27
1.6.1	<i>Métodos cromatográficos</i>	27
1.6.2	<i>Métodos electroforéticos</i>	28
1.6.3	<i>Métodos imunológicos</i>	30
1.6.4	<i>Métodos de precipitação de proteínas</i>	32
1.7	Objectivos do trabalho	34
<b>2</b>	<b>Materiais e métodos</b>	<b>35</b>
2.1	Amostragem	36
2.1.1	<i>Amostras de malte</i>	38
2.1.2	<i>Amostras de mosto e cerveja</i>	39
2.2	Cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa	40
2.2.1	<i>Padrões e reagentes</i>	40
2.2.2	<i>Equipamento</i>	40
2.2.3	<i>Condições cromatográficas</i>	41
2.2.4	<i>Recolha de fracções proteicas de amostras de malte</i>	42



---

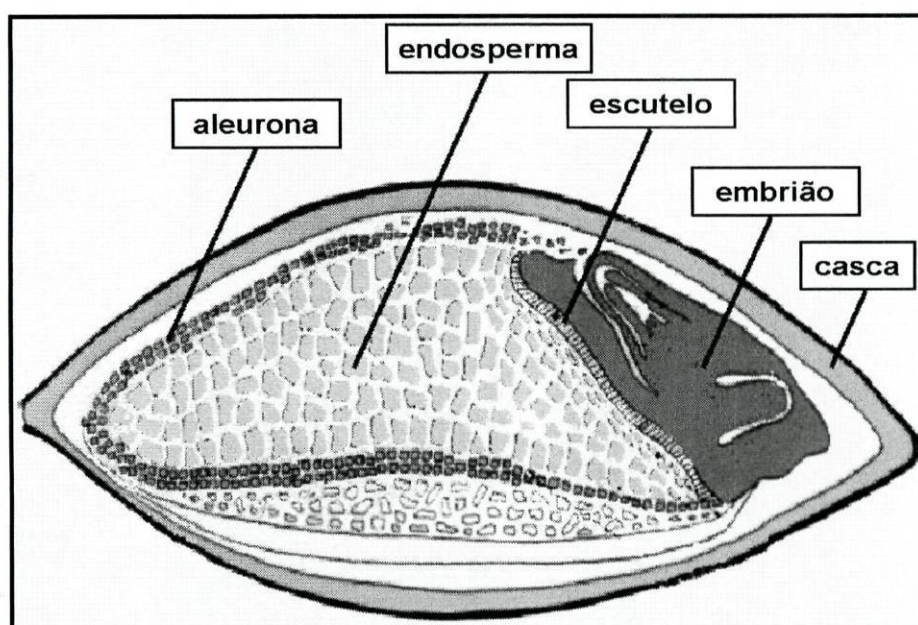
2.3	Análise estatística dos resultados obtidos por cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa-----	43
2.4	Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio--	45
2.4.1	<i>Quantificação do conteúdo proteico pelo método de Bradford</i> ---	45
2.4.2	<i>Padrões e reagentes</i> -----	45
2.4.3	<i>Equipamento</i> -----	46
2.4.4	<i>Condições electroforéticas</i> -----	47
2.5	Caracterização físico-química e sensorial das amostras analisadas -	49
<b>3</b>	<b>Resultados</b> -----	<b>50</b>
3.1	Cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa-----	51
3.1.1	<i>Amostras de malte</i> -----	51
3.1.2	<i>Amostras de mosto e cerveja</i> -----	54
3.2	Análise estatística dos resultados obtidos por cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa-----	57
3.2.1	<i>Amostras de malte</i> -----	57
3.2.2	<i>Amostras de mosto e cerveja</i> -----	68
3.3	Método de Bradford -----	76
3.4	Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio--	79
3.4.1	<i>Amostras de malte</i> -----	79
3.4.2	<i>Amostras de mosto e cerveja</i> -----	83
3.5	Caracterização físico-química e sensorial das amostras analisadas -	85
<b>4</b>	<b>Discussão e conclusões</b> -----	<b>90</b>
<b>5</b>	<b>Bibliografia</b> -----	<b>99</b>

## **1 Introdução**

- 1.1. Cevada e maltagem
- 1.2. A cerveja
- 1.3. Proteínas e polipeptídeos do malte, do mosto e da cerveja
- 1.4. Outros constituintes da cerveja
- 1.5. Relação entre hordeínas e qualidade de maltagem
- 1.6. Métodos analíticos utilizados no estudo das proteínas e dos polipeptídeos do malte, do mosto e da cerveja
- 1.7. Objectivos do trabalho

## 1.1 Cevada e maltagem

A produção de cerveja é precedida de um processo designado por maltagem, onde os grãos de cevada são transformados em malte. A cevada, limpa, desembaraçada de grãos estranhos e calibrada, é armazenada até ao final da dormência (fase de reduzida actividade biológica). Quando atinge o máximo do seu poder germinativo, procede-se à maltagem. Os grãos de cevada têm uma forma aproximadamente ovóide, são envolvidos por camadas protectoras de casca e contêm um pequeno embrião numa das extremidades, que, em condições adequadas, se desenvolve numa nova planta. O endosperma constitui a maior parte do grão (Figura 1).



**Figura 1** – Secção longitudinal de um grão de cevada.

O endosperma é constituído, em grande parte, por células mortas de grandes dimensões, que apresentam paredes celulares espessas, constituídas principalmente por  $\beta$ -glucanos (polímeros de moléculas de glucose ligadas por ligações  $\beta$ -glicosídicas). Essas células estão preenchidas com grânulos de amido, envolvidos por uma matriz de hordeínas, que são proteínas de



armazenamento insolúveis, responsáveis pelo fornecimento de peptídeos e de aminoácidos para a planta em desenvolvimento.

O principal objectivo da maltagem é a eliminação da maioria das paredes celulares de  $\beta$ -glucanos e de algumas das proteínas insolúveis, de forma a permitir o acesso das enzimas aos grãos de amido. Simultaneamente, são activadas enzimas que transformam o amido em açúcares solúveis.

A cevada utilizada para maltagem deve ter baixo conteúdo em proteínas. A sua quantidade total na cevada correlaciona-se negativamente com o extracto do respectivo malte (Howard *et al.*, 1996). Uma elevada quantidade de proteínas dificulta o acesso dos grãos de amido às amilases (Peltonen *et al.*, 1994).

A qualidade do malte depende da variedade da cevada escolhida, das condições de cultivo e armazenamento utilizadas e do processo de maltagem aplicado (Østergaard *et al.*, 2002).

O processo da maltagem é subdividido nas etapas de molha, germinação e secagem. A molha, que decorre num período de 2-3 dias, começa pela mistura dos grãos de cevada com água, com a finalidade de aumentar o nível de humidade dos 12 para os 40% e activar os processos metabólicos. Os grãos de cevada são volteados várias vezes e a água, que com eles contacta, é periodicamente renovada, com a finalidade de promover uma correcta oxigenação dos mesmos. O aumento do conteúdo em água estimula o metabolismo no embrião e hidrata o amido do endosperma. Com o aumento da actividade do embrião são produzidas giberelinas, hormonas que se difundem na aleurona (camada de matéria azotada de reserva), estimulando a produção de enzimas hidrolíticas durante a germinação. A etapa da molha termina quando começam a surgir, nas cascas dos grãos, umas pequenas radículas brancas. Neste ponto, os grãos apresentam-se inchados.

O passo seguinte é o da germinação, que demora 4 a 6 dias. Nesta etapa a cevada é estimulada a germinar, mantendo-se os grãos a uma temperatura de 12-18°C e a uma humidade adequada. Nesta etapa é produzido dióxido de carbono e calor. Sob a influência das giberelinas, várias enzimas hidrolíticas são produzidas durante a germinação, incluindo as que degradam o amido, as proteínas e as paredes celulares. Nas enzimas proteolíticas estão incluídas carboxipeptidases, que degradam as cadeias de

aminoácidos a partir da extremidade carboxílica, e endopeptidases, que quebram as ligações peptídicas no interior das cadeias de aminoácidos. No final desta etapa os grãos de cevada passam a ser designados por malte "verde". A germinação termina quando o malte atinge o grau de desagregação pretendido pelo cervejeiro.

A última etapa é a da secagem, que tem a finalidade de diminuir o conteúdo de humidade do malte (até cerca de 5%) e parar a germinação, impedindo que a semente se desenvolva e consuma o amido disponível. Os maltes são submetidos a diferentes temperaturas (entre 80 e 105°C). Os regimes de temperatura escolhidos na etapa da secagem determinam a cor do malte e a quantidade de enzimas disponíveis para as fases posteriores do processo de produção de cerveja. O malte seco e desembaraçado de radículas pode ser armazenado durante vários anos, desde que se mantenha o grau de humidade entre 5 e 6%.



## 1.2 A cerveja

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo. É obtida por fermentação do mosto produzido a partir de grãos de cereais (principalmente malte de cevada) e adicionada de lúpulo. A fermentação é realizada por estirpes de leveduras seleccionadas.

A origem da cerveja está relacionada com o facto de o ser humano ter abandonado os seus hábitos nómadas e de se ter dedicado à agricultura como principal meio de subsistência, o que terá acontecido há cerca de 10000 – 15000 anos. A verdadeira origem da cerveja, no entanto, encontra-se perdida no tempo e ninguém pode afirmar, com rigor, o momento exacto em que a primeira cerveja foi produzida. Os registos mais antigos de produção de cerveja têm cerca de 6000 anos e referem-se ao povo Sumério. Supõe-se que os Sumérios terão descoberto, por acaso, o processo de fermentação da cevada. Esta civilização foi ainda capaz de repetir o processo, sendo, por isso, considerada a primeira cultura civilizada produtora de cerveja. Ao longo da história, a cerveja teve também uma grande importância para várias civilizações (Babilónios, Egípcios, Gregos, Romanos, Teutões (ou Alemães antigos)) e durante toda a idade média, até aos dias de hoje.

Os dois principais tipos de cerveja são “Ale” e “Lager”, de fermentação alta e baixa, respectivamente, embora exista uma enorme variedade de cervejas no mercado. São ambos adicionados de lúpulo e produzidos, principalmente, a partir de cevada maltada. As características que distinguem estes dois tipos de cerveja são o tipo de levedura e a temperatura utilizados na sua fermentação. Dos tipos “Ale” e “Lager” derivam muitos outros, que diferem entre si nas suas características sensoriais, na quantidade de álcool, de extracto e de malte e no tipo de fermentação. A maior parte dos tipos clássicos de cerveja são originários da Europa, sendo, no entanto, produzidos com sucesso por todo mundo. Não existem regras rígidas em qualquer um dos tipos de cerveja, sendo esperadas variações entre eles, no que diz respeito ao “flavour”, aos ingredientes e aos métodos de produção utilizados.



A cerveja é constituída por água, malte, lúpulo e levedura. Por vezes, são ainda utilizadas outras matérias-primas. Todos os constituintes da cerveja influenciam a sua qualidade final, atribuindo-lhe características especiais.

A água corresponde a cerca de 90% da composição total da cerveja, sendo utilizada em quase todos os passos da sua produção. As características da água utilizada para a preparação do mosto tem uma grande influência na qualidade da cerveja.

O malte de cevada, termo utilizado para definir o cereal germinado e seco, é outro dos constituintes da cerveja. A cevada não é um cereal propriamente adequado para a panificação, sendo, contudo, óptimo para a produção de cerveja. Tipos específicos de malte são utilizados na produção de diferentes tipos de cerveja, cada qual atribuindo-lhe um sabor e um corpo característicos.

O lúpulo (*Humulus lupulus*), por sua vez, é uma planta trepadeira, cuja função principal é conferir o amargor à cerveja, contribuindo, ainda, no seu aroma característico. Existem mais de 50 variedades cultivadas no mundo. As flores fêmea, em forma de cone, sendo utilizadas para conferir o sabor amargo e aroma característico, apresentam, também, propriedades conservantes e contribuem na estabilidade da espuma do produto final.

As leveduras são fungos unicelulares pertencentes ao filo *Ascomycetes* e à classe *Hemiascomycetes*. São consideradas como o ingrediente mais importante na produção de cerveja. As leveduras utilizadas na produção de cerveja pertencem exclusivamente ao género *Saccharomyces*. São reconhecidos, essencialmente, dois tipos de leveduras: as responsáveis pela fermentação alta (*Saccharomyces cerevisiae*) e as responsáveis pela fermentação baixa (*Saccharomyces uvarum*). As leveduras são utilizadas na produção de cerveja pela sua capacidade de converter os açúcares do mosto em etanol. A primeira fase da fermentação é marcada pela quebra de proteínas, dando origem aos seus aminoácidos constituintes. Na fase seguinte do processo a levedura consome oxigénio e diminui o pH do mosto. A glucose é metabolizada em dióxido de carbono, água e ácido pirúvico, transformando-se este, posteriormente, em etanol. As leveduras não são capazes de fermentar todos os tipos de açúcares, razão pela qual a cerveja apresenta um sabor adocicado no final da fermentação.

Finalmente, as outras matérias-primas utilizadas na produção de cerveja podem ser xaropes, açúcares ou grãos não maltados de alguns cereais. O milho, o arroz, a aveia, o centeio, o trigo e a própria cevada são alguns exemplos de cereais utilizados na produção de cerveja. Estes cereais, além de serem uma fonte de hidratos de carbono, mais económica do que a cevada maltada, fornecem características específicas à cerveja.

Simplificando o processo, pode dizer-se que na produção de cerveja se utiliza água e malte para criar um mosto adocicado, ao qual se adiciona lúpulo para aromatizar e levedura para que se realize o processo de fermentação. O processo básico de produção de cerveja é simples, mas a sua execução é altamente sofisticada. A produção inicia-se com a brassagem. Nesta fase, o malte é inicialmente moído de forma grosseira, dando origem a uma mistura de farinha e cascas. A integridade das cascas é importante, uma vez que estas vão, numa fase posterior, formar um leito propício à filtração. Posteriormente, é adicionada água, a uma temperatura adequada para a actuação dos sistemas enzimáticos.

O objectivo da brassagem é a extracção enzimática da totalidade do amido e a sua posterior transformação numa mistura de açúcares fermentáveis. Durante esta fase são também extraídas proteínas, que são degradadas em peptídeos e aminoácidos, e  $\beta$ -glucanos, que são degradados em açúcares mais simples. As  $\alpha$  e  $\beta$ -amilases transformam o amido (constituído por 75% de amilopectina e 25% de amilose) em açúcares fermentáveis. A  $\alpha$  e a  $\beta$ -amilase, actuando em conjunto, degradam a amilose em maltose, maltotriose, maltotetraose e glucose. A amilopectina, por sua vez, origina pequenas dextrinas ramificadas, que não são fermentáveis. Dessa forma, é obtido um líquido doce, conhecido como mosto. Nenhuma quantidade de amido deverá sobreviver a esta fase da produção de cerveja.

É muito importante controlar o pH, o tempo e a temperatura da mistura, uma vez que são estes os factores que vão influenciar a maior ou menor extensão da metabolização efectuada pelas enzimas. No final desta fase, que demora de 2 a 4 horas e termina a uma temperatura de 75-76°C, o mosto tem uma concentração de extracto de 20 a 22g por cada 100g de mosto.



Após a brassagem existe uma fase de filtração do mosto, onde se vai proceder à separação do mosto propriamente dito das partículas sólidas nele contidas ("drêche"). Esta fase demora cerca de duas horas e é efectuada, a uma temperatura de 75-80°C, em Cubas Filtro ou Filtros Prensa. Enquanto que o mosto segue para fases posteriores, as partículas sólidas são vendidas como alimento para gado.

A fase seguinte do processo é a da ebulição do mosto. Nesta fase o mosto é levado vigorosamente à ebulição, durante cerca de 1,5 a 2 horas, na presença do lúpulo. Esta operação tem como objectivos principais esterilizar o mosto, desnaturar as enzimas, coagular uma grande parte das proteínas solúveis (posteriormente removidas), eliminar, por evaporação, compostos com sabor desagradável e extrair os  $\alpha$ -ácidos (e isomerizá-los em iso- $\alpha$ -ácidos) e os óleos essenciais do lúpulo para o mosto, atribuindo-lhe o amargor e o sabor característicos da cerveja.

Os óleos essenciais do lúpulo são voláteis, podendo ser perdidos durante a fase da ebulição do mosto. Por vezes, os cervejeiros adicionam uma fracção de lúpulo, mais rica em compostos aromáticos, apenas na fase final da ebulição, o que lhes permite obter uma coagulação proteica satisfatória e uma isomerização de  $\alpha$ -ácidos eficiente, sem perder a qualidade do aroma desejada.

Durante a fase da ebulição do mosto ocorrem também reacções químicas de condensação entre açúcares redutores e aminas primárias (particularmente aminoácidos), resultando na formação de aldossilaminas (que sofrem rearranjos químicos subsequentes) e no escurecimento do mosto.

Após a fase da ebulição do mosto, segue-se a fase da separação da fracção insolúvel do mosto. Nesta fase as proteínas coaguladas e o lúpulo remanescente são removidos por simples decantação, que pode ser seguida por centrifugação ou filtração com "Kieselghur".

É a partir desta fase que se realiza a fermentação, subdividida em quatro etapas: arrefecimento do mosto, fermentação principal, maturação e estabilização coloidal. Na etapa do arrefecimento do mosto, como o próprio nome indica, o mosto quente é arrefecido, em permutadores de placas, até à temperatura adequada ao tipo de fermentação pretendido: 16 a 18°C, em fermentação alta, ou 7 a 10°C, em fermentação baixa.

De seguida, passa-se à fermentação principal. O mosto arrefecido é oxigenado e adicionado de levedura pura. A oxigenação é necessária para a síntese de ácidos gordos e esteróis, componentes fundamentais da membrana celular da levedura. A fermentação alcoólica posterior é um processo anaeróbio. A fermentação dura cerca de 3 a 5 dias, em fermentação alta, ou de 6 a 8 dias, em fermentação baixa. Na primeira fase da fermentação a quantidade de levedura multiplica-se 3 a 4 vezes, mantendo-se, a partir daí, estacionária. Durante a fase do crescimento, a levedura consome uma parte importante dos aminoácidos do mosto e excreta álcoois superiores e ésteres indispensáveis ao “flavour” da cerveja. Os açúcares glucose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose são quase totalmente consumidos durante a fermentação, obtendo-se etanol e dióxido de carbono. Actualmente, com a utilização de tanques de grande profundidade, é possível obter cerveja com uma saturação final em dióxido de carbono adequada (5 g/L).

A etapa seguinte é a da maturação da cerveja, que deve ser mantida por um período de 12 a 30 dias. Os principais objectivos desta etapa são: melhorar o sabor, o aroma e o brilho da cerveja e remover possíveis resíduos sólidos. Uma cerveja recentemente produzida contém compostos com “flavour” indesejável, que devem ser removidos. Durante a maturação, a pequena quantidade de levedura que ainda se mantém em contacto com a cerveja promove dois efeitos: produção de mais dióxido de carbono, o que leva à eliminação de compostos voláteis indesejáveis, e remoção de outros compostos activos no “flavour” da cerveja. O diacetilo, responsável por sabor desagradável, é degradado nesta etapa, dando origem a compostos não influentes no “flavour” do produto final.

Numa época anterior ao aparecimento da refrigeração artificial, a etapa da maturação era efectuada em caves subterrâneas frescas, durante longos períodos de tempo (geralmente vários meses). Mais recentemente, e para a maioria das cervejas, este período de maturação foi reduzido a dias.

É importante para a indústria cervejeira controlar a extensão da etapa da maturação. A forma como esta etapa se deve processar depende do tipo de cerveja que se está a produzir. Uma certa quantidade de dióxido de carbono, recolhido durante a etapa da fermentação principal, pode ser adicionada à cerveja durante esta etapa.



Após a maturação, a temperatura da cerveja é levada quase ao ponto de congelação, favorecendo a formação de complexos entre proteínas e polifenóis, responsáveis pelo aparecimento de turvação. Assegura-se, assim, a sua posterior estabilidade coloidal. A cerveja é mantida alguns dias a esta temperatura.

A fase seguinte de clarificação da cerveja assegura o seu brilho e a sua estabilidade coloidal. Este objectivo é alcançado pela eliminação dos complexos proteína-polifenóis e pela retenção da quase totalidade das leveduras. A clarificação é realizada em centrífugas, em filtros de placas ou em velas com adjuvantes de filtração.

A fase da estabilização biológica, por sua vez, tem como objectivo eliminar a totalidade dos microorganismos existentes na cerveja. Esta eliminação pode ser efectuada a frio, utilizando a filtração esterilizante, ou a quente, utilizando a pasteurização. A pasteurização pode ser aplicada imediatamente antes (pasteurização "flash") ou depois (pasteurização túnel) da bebida ter sido introduzida na sua embalagem final.

A última fase da produção da cerveja consiste no seu acondicionamento em recipientes apropriados. Durante esta fase é necessário minimizar o contacto da cerveja com oxigénio, ferro e cobre, com o objectivo de assegurar que a bebida conserve as suas qualidades de limpidez, gosto e aroma por um longo período de tempo.

Do ponto de vista nutricional, a cerveja é uma bebida moderada em álcool, com quantidades equilibradas de hidratos de carbono, proteínas, fibras, vitaminas do complexo B e sais minerais essenciais. Além de possuir baixas quantidades de sal e gordura, contém ainda ingredientes minoritários, como é o caso de alguns antioxidantes, que contribuem na prevenção de determinadas doenças degenerativas. Desde que bebida com moderação, a cerveja tem uma importante contribuição na dieta alimentar.

### 1.3 Proteínas e polipeptídeos do malte, do mosto e da cerveja

A quantidade de proteína existente na cevada é um factor determinante na qualidade final da cerveja. Um excesso de proteína reduz a quantidade de hidratos de carbono disponíveis, influenciando negativamente o processo de produção de cerveja (Peltonen *et al.*, 1994; Fox *et al.*, 2002).

As proteínas existentes nos grãos de cevada constituem cerca de 8-15% da sua massa (Osman *et al.*, 2002). As proteínas mais abundantes são as hordeínas, que correspondem a cerca de 40-50% da quantidade total de proteína. Além das hordeínas, outras proteínas foram identificadas nos grãos de cevada, incluindo albuminas, glutelinas (globulinas), friabilina, inúmeras enzimas (endoproteases, amilases, dextrinase, outras enzimas relacionadas com a glicólise, com o metabolismo do amido e com o ciclo do ácido cítrico), proteínas de defesa (serpinas, inibidores), “chaperones” e outras proteínas com função desconhecida (Finnie *et al.*, 2002; Fox *et al.*, 2002; Osman, 2003; Østergaard *et al.*, 2002; Østergaard *et al.*, 2004; Borén *et al.*, 2004).

A cerveja contém aproximadamente 500 mg/L de proteína, dependendo do processo de produção utilizado. As proteínas encontram-se na forma de polipeptídeos glicosilados, com cerca de 10-40 kDa (Leiper *et al.*, 2003). Uma grande parte das proteínas de peso molecular acima dos 17000 são precipitadas e removidas durante a fase da ebulição do mosto (Hughes e Baxter, 2001c). Enquanto que alguns dos polipeptídeos existentes na cerveja não apresentam qualquer função na cerveja (excepto na contribuição nutricional e no “flavour”), outros são responsáveis pela formação de turvação coloidal e ainda outros (cerca de 25%) intervêm no processo de estabilização da espuma (Leiper *et al.*, 2003).

Os polipeptídeos da cerveja, originários das proteínas da cevada, são os principais estabilizadores da sua espuma (Bamforth, 1985). A sua quantidade na cerveja, que é uma indicação da qualidade da espuma (Evans *et al.*, 1999a),



depende do tipo de cevada utilizado (Dale *et al.*, 1989), da região e do país onde esta foi produzida (Ishibashi *et al.*, 1997).

Segundo Bamforth (1999), existem actualmente duas escolas de pensamento no que diz respeito ao papel dos polipeptídeos na espuma da cerveja: uma defende que existem certas proteínas específicas (proteína Z e LTP1, por exemplo) que têm uma contribuição primária na estabilidade da espuma; a outra afirma que a hidrofobicidade dos polipeptídeos é a característica essencial para a sua capacidade de estabilização da espuma. Mesmo os investigadores que defendem a importância de um determinado número de polipeptídeos, na estabilidade de uma espuma, têm apresentado evidências da importância da hidrofobicidade, na referida estabilidade (Hughes *et al.*, 1999; Cooper *et al.*, 2002; Kapp e Bamforth, 2002; Ferreira *et al.*, 2005). Outros investigadores concluíram que a conformação dos polipeptídeos (Onishi *et al.*, 1999) é também importante para a estabilização da espuma.

Os estudos realizados ao longo dos últimos anos concluíram inicialmente que quanto maior fosse o polipeptídeo, maior seria a sua capacidade para estabilizar uma espuma (Dale e Young, 1987). Posteriormente, considerou-se que os polipeptídeos com uma massa molecular específica apresentariam maior influência positiva sobre a espuma, tendo a proteína Z e a LTP1 sido sugeridas, por alguns autores, como dois dos polipeptídeos mais importantes nessa estabilidade. Outros estudos sugeriram ainda que os polipeptídeos carregados positivamente ou os que continham hidratos de carbono na sua estrutura seriam os mais eficazes na estabilização da espuma (Bamforth, 1995).

Para além do seu papel na qualidade da espuma, as proteínas da cerveja são essenciais pela sua contribuição no "flavour", na textura, no corpo, na cor, e no valor nutricional da cerveja (Osman *et al.*, 2003).

Na Tabela 1 são resumidas as características mais importantes das proteínas e dos polipeptídeos do malte, do mosto e da cerveja.

**Tabela 1** – Resumo das características das proteínas e dos polipeptídeos do malte, do mosto e da cerveja.

Composto	Origem	Características
Proteína Z (antigénio 1)	Proteína Z da cevada (albumina)	Cevada e malte: duas isoformas – proteína Z4 e proteína Z7; Proteína Z4 é mais abundante (80%) Glicoproteína Peso molecular: cerca de 40000 Ponto isoeléctrico: 5,5 – 5,8 (cevada e malte); 5,1–5,4 (cerveja) Termoestável / Resistente à proteólise Elevada hidrofobicidade Papel na estabilização da espuma e na turvação da cerveja Quantidade típica na cerveja: 20 – 170 mg/L
LTP1	LTP1 da cevada (albumina)	Homóloga de inibidores da amilase e da protease e das “Lipid Transfer Proteins” Glicoproteína Composta por 4 segmentos em $\alpha$ -hélice estabilizados por 4 pontes dissulfureto intramoleculares Peso molecular: cerca de 9700 Ponto isoeléctrico: 9 Termoestável / Resistente à proteólise Papel na formação da espuma
Hordeínas	Cevada	Proteínas (prolaminas) de armazenamento 40-50% da quantidade total de proteína do grão Dividem-se em hordeínas A (<20 kDa), B (30-45 kDa), C (45-75 kDa), D (100 kDa) e $\gamma$ (não referido) Hordeínas B: 70-90% do total das hordeínas Podem existir na forma de monómeros ou de agregados Extraídas por misturas álcool/água Algumas são termoestáveis Podem ser prejudiciais para os portadores de doença celíaca Estabilização moderada da espuma (inferior à das albuminas)
Fragmentos de hordeínas e glutelinas	Hordeínas e glutelinas da cevada	Polipeptídeos do mosto: significativa contribuição de fragmentos de hordeínas Caracterização por SDS-PAGE complicada, devido à presença de um grande grupo de bandas, com diversos pesos moleculares Susceptíveis tanto à proteólise como à desnaturação Diferentes papéis: promotores de espuma – ricos em cisteína (Vaag <i>et al.</i> , 1999); envolvidos na turvação – polipeptídeos com cerca de 15–32 kDa, ricos em prolina (Leiper <i>et al.</i> , 2003); com influência positiva na espuma – polipeptídeos com cerca de 8–18 kDa (Douma <i>et al.</i> , 1997).
Albuminas	Cevada	Extraídas por soluções aquosas Maior capacidade de estabilização da espuma após desnaturação Resistentes à hidrólise por cisteíno-proteases Estabilização moderada da espuma (superior à das hordeínas)
Proteases	Cevada	Responsáveis pela degradação das proteínas de armazenamento do endosperma da cevada Cisteíno-proteases: 90% da actividade proteolítica total Exemplos de cisteíno-proteases: EP-A, EP-B e aleuraina Muito resistentes à etapa da secagem pH óptimo de actividade: 4; temperatura óptima de actividade: 40°C
Proteínas provenientes de cereais não maltados	Diversos cereais	Gluteninas (trigo), gliadinas (trigo), secalinas (centeio) e zeínas (milho) – proteínas de armazenamento, pertencentes à família das prolaminas Puroindolinas (trigo): capacidade de ligação aos lípidos livres em solução; impedem a destabilização da espuma



### 1.3.1 Proteína Z

A forma da proteína Z presente na cerveja (também designada por antigénio 1) é originária da proteína Z da cevada (Hejgaard e Kaersgaard, 1983), uma albumina (Sørensen *et al.*, 1993; Gibson *et al.*, 1995) que pode estar presente em duas isoformas, a proteína Z4 e a proteína Z7 (Evans *et al.*, 1999b). Na cevada e no malte a proteína Z4 é a mais abundante (80%) (Evans *et al.*, 1999b).

O peso molecular da proteína Z é de cerca de 40000 (Hejgaard e Kaersgaard, 1983; Sørensen *et al.*, 1993; Curioni *et al.*, 1995; Leiper *et al.*, 2003). Esta proteína é formada por dois polipeptídeos geneticamente diferentes (conhecidos por antigénio 1a e antigénio 1b), imunologicamente relacionados, separáveis por SDS-PAGE. Os dois polipeptídeos presentes na cerveja derivam de duas albuminas do endosperma da cevada (proteína Z4 e proteína Z7) (Curioni *et al.*, 1995).

Enquanto que o antigénio 1 tem um ponto isoeléctrico de 5,1-5,4 (Hejgaard e Kaersgaard, 1983), a proteína Z da cevada, que lhe deu origem, apresenta um ponto isoeléctrico de 5,5-5,8 (Hejgaard, 1982). Esta diferença pode ser devida à glicosilação dos resíduos de lisina no antigénio 1, bem como ao menor conteúdo neste aminoácido (cerca de 16% inferior) (Hejgaard e Kaersgaard, 1983). A proteína Z é uma glicoproteína que contém hexoses e pentoses (Lusk *et al.*, 1987; Leiper *et al.*, 2003).

A proteína Z mantém-se praticamente inalterada ao longo do processo de produção da cerveja (Gibson *et al.*, 1995; Yokoi *et al.*, 1989; Hughes *et al.*, 1999). É uma proteína termoestável (Curioni *et al.*, 1995) e resistente à proteólise (Jégou *et al.*, 2000), devido às suas propriedades anti-proteásicas (Evans *et al.*, 1999a).

A proteína Z tem influência na espuma e na turvação da cerveja (Hejgaard e Kaersgaard, 1983; Curioni *et al.*, 1995). Está presente na cerveja numa concentração de cerca de 20-170 mg/L (Curioni *et al.*, 1995; Hughes *et al.*, 1999). Segundo Yokoi *et al.* (1989), a proteína Z é vantajosa para a estabilidade da espuma da cerveja, devido à sua elevada hidrofobicidade, ao



seu ponto isoeléctrico próximo do pH da cerveja e à sua peculiar actividade viscométrica de superfície.

O efeito da proteína Z na estabilidade da espuma é ainda controverso. Vários investigadores propuseram que esta proteína funciona como estabilizador de espuma (Yokoi *et al.*, 1989; Sørensen *et al.*, 1993; Lusk *et al.*, 1995; Douma *et al.*, 1997). Contudo, outros investigadores, ao utilizarem cervejas após a remoção da proteína Z (Hollemans e Tonies, 1989; Vaag *et al.*, 1999), ou espuma de cervejas produzidas a partir de maltes pobres em proteína Z4 (Gibson *et al.*, 1995), não observaram uma perda significativa da estabilidade das respectivas espumas. Por outro lado, Evans *et al.* (1999a e 1999b) afirmaram que apenas o componente Z4 da proteína Z, a forma dominante desta proteína (Gibson *et al.*, 1995), está relacionado com a estabilidade da espuma, não havendo, no entanto, qualquer relação entre o componente Z7 e a referida estabilidade.

Sørensen *et al.* (1993) demonstraram que uma fracção de cerveja que continha proteína Z, mas não LTP1, não produzia espuma. Contudo, quando esta fracção era adicionada a uma outra, que continha LTP1, a estabilidade da espuma desta era melhorada. Para Leiper *et al.* (2003), a proteína Z parece não apresentar qualquer função directa na formação da espuma, podendo, no entanto, desempenhar um papel na estabilização da mesma, depois de esta ter sido formada.

### 1.3.2 LTP1

A “Lipid Transfer Protein 1” (LTP1) da cerveja deriva da LTP1 da cevada, que é uma albumina (Jégou *et al.*, 2000) existente na aleurona dos grãos do referido cereal (Lindorff-Larsen e Winther, 2001; Leiper *et al.*, 2003). Esta proteína foi inicialmente designada por “Probable Amylase/Protease Inhibitor” (PAPI), uma vez que se verificou que era homóloga de inibidores da amilase e de proteases. Posteriormente, ao demonstrar-se que era homóloga das “Lipid Transfer Proteins” (LTPs), passou a designar-se por LTP1 (Leiper *et al.*, 2003).

O peso molecular da LTP1 é geralmente referido como sendo cerca de 9700 (Bech *et al.*, 1995; Lusk *et al.*, 1995; Jones e Marinac, 1997; Vaag *et al.*, 1999; Jégou *et al.*, 2000; Leiper *et al.*, 2003). É uma proteína constituída por 91 aminoácidos (Lindorff-Larsen e Winther, 2001; Leiper *et al.*, 2003), com um ponto isoeléctrico de 9 (Jégou *et al.*, 2000; Lindorff-Larsen e Winther, 2001).

Quanto à sua conformação, a LTP1 da cevada é composta por quatro segmentos em  $\alpha$ -hélice, estabilizados por quatro pontes dissulfureto intramoleculares (Bech *et al.*, 1995; Douliez *et al.*, 2000) e um longo e flexível segmento C-terminal (Bech *et al.*, 1995). A forma da LTP1 encontrada na espuma contém oito resíduos de cisteína que, provavelmente, estarão presentes como cistinas (forma oxidada) na cerveja (Lusk *et al.*, 1995) e quatro resíduos de lisina, que são os potenciais locais de glicosilação (Jégou *et al.*, 2000).

A LTP1 é glicosilada, provavelmente devido a reacções de Maillard, o que pode explicar a sua resistência a numerosas enzimas, que com ela entram em contacto durante o processamento da cerveja (Jégou *et al.*, 2000). Enquanto que alguns investigadores sugerem que a LTP1 da cevada inibe algumas endoproteases da cisteína do malte (Jones e Marinac, 1997), outros refutam essa hipótese (Davy *et al.*, 1999).

Mais recentemente, foi confirmada a existência de duas formas de LTP1 na cevada: a LTP1, com um peso molecular de 9689, e a LTP1b, com um peso molecular de 9983 (Jégou *et al.*, 2000; Leiper *et al.*, 2003). Ambas as formas são modificadas durante o processamento da cerveja, quer por redução das pontes dissulfureto, quer por glicosilação (Jégou *et al.*, 2000).

A LTP1 demonstra elevada estabilidade em relação ao calor e às proteases (Lindorff-Larsen e Winther, 2001). Segundo Lusk *et al.* (1995), as quatro pontes dissulfureto da LTP1, provavelmente, protegerão esta proteína durante as fases de maltagem e de produção da cerveja. No entanto, Jégou *et al.* (2000) concluíram que a LTP1 sofre modificações químicas marcantes, como redução das pontes dissulfureto, hidrólise e reacções de Maillard. Foi ainda proposto que as modificações sofridas pela LTP1, durante o processamento da cerveja, induziam um maior potencial de formação de espuma (Sørensen *et al.*, 1993). Nierop *et al.* (2004), por outro lado, concluíram



que a desnaturação da LTP1 reduz a sua capacidade de se ligar aos ácidos gordos livres, prejudiciais para a espuma.

Lusk *et al.* (1999) verificaram que a LTP1 perde a sua estrutura em  $\alpha$ -hélice durante a fase da ebulição do mosto e o seu único resíduo de metionina é oxidado. Estes autores atribuíram a esta forma de LTP1, presente na espuma, a designação de fLTP1 ("foam Lipid Transfer Protein 1").

A LTP1 da cevada pertence a uma extensa família de proteínas das plantas, designadas por "non-specific Lipid Transfer Proteins" (nsLTP). A função "in vivo" destas proteínas é desconhecida, no entanto, foi sugerido que estão envolvidas em respostas a situações de stress, tais como: exposição a agentes patogénicos, ausência de água, temperatura muito elevada ou muito baixa e presença de sais. Outra função proposta foi a de transportadoras de monómeros para a síntese de cutina (Lindorff-Larsen e Winther, 2001).

Existem referências a uma segunda LTP não específica (a LTP2), com 7 kDa (Douliez *et al.*, 2000), não sendo feitas, no entanto, quaisquer referências a uma possível função na espuma da cerveja.

Enquanto que alguns investigadores sugerem que a LTP1 está envolvida na estabilidade da espuma (Lusk *et al.*, 1995; Leiper *et al.*, 2003), outros propõem que este polipeptídeo funciona não como estabilizador, mas sim como promotor de formação de espuma (Sørensen *et al.*, 1993). Por sua vez, Evans *et al.* (1999a) demonstraram que a LTP1 não está relacionada com a estabilidade da espuma.

### 1.3.3 Hordeínas

As hordeínas são proteínas (prolaminas) de armazenamento, existentes nos grãos de cevada, representando cerca de 40-50% da quantidade total de proteína encontrada no grão. São geralmente divididas em hordeínas A (<20 kDa), B (30-45 kDa), C (45-75 kDa) e D (100 kDa) (Schmitt *et al.*, 1989; Peltonen *et al.*, 1994; Fox *et al.*, 2002). As hordeínas A não são consideradas verdadeiras proteínas de armazenamento (Peltonen *et al.*, 1994). Alguns autores referem a existência de hordeínas  $\gamma$  (Shewry *et al.*, 1985; Brennan *et al.*, 1998; Davy *et al.*, 1998; Molina-Cano *et al.*, 2001), não fazendo, no entanto,



qualquer alusão ao seu peso molecular. As fracções B e C representam 70-90% e 10-12% do conteúdo total de hordeínas, respectivamente, enquanto as hordeínas D e  $\gamma$  são fracções minoritárias (Shewry *et al.*, 1985; Molina-Cano *et al.*, 2001).

Ao contrário das hordeínas C, as hordeínas B e D são ricas em resíduos de cisteína (Borén *et al.*, 2004). As hordeínas podem existir na forma de monómeros ou de agregados. As formas monoméricas, que constituem a totalidade das hordeínas C, assim como uma parte das hordeínas B, podem ser extraídas por soluções de detergentes ou misturas de água e álcool. Por sua vez, os agregados constituídos por hordeínas B e D, ligadas por ligações dissulfureto, são extraídos na presença de um agente redutor (Sheehan e Skeritt, 1997).

Segundo Fox *et al.* (2002), as diferenças entre as hordeínas B e C de diferentes cevadas são úteis na identificação de variedades. Estas proteínas apresentam, no estado nativo, uma capacidade de estabilização de espuma de cerveja inferior à apresentada pelas albuminas. Sabe-se que o seu tratamento com ácido não afecta a sua capacidade de estabilização de espuma. Por sua vez, o tratamento térmico aumenta ligeiramente a referida estabilização, embora algumas hordeínas e regiões específicas da sequência de aminoácidos das hordeínas sejam resistentes à desnaturação pelo calor (Sheehan e Skeritt, 1997). A desnaturação das hordeínas leva a um aumento da sua hidrofobicidade, característica importante para a estabilidade da espuma (Kapp e Bamforth, 2002). Uma proteólise limitada, efectuada por cisteíno-proteases, leva a um aumento substancial das suas capacidades estabilizadoras de espuma. No entanto, a acção da protease A (da levedura) resulta na diminuição da referida capacidade estabilizadora (Kapp e Bamforth, 2002).

Do ponto de vista de saúde humana, as hordeínas podem ser prejudiciais para os portadores de doença celíaca, que deverão evitar consumir cevada ou malte. Actualmente, não existe ainda consenso acerca do facto da cerveja poder, ou não, ser consumida, com segurança, pelos portadores da referida doença (Hughes e Baxter, 2001d).

### 1.3.4 Fragmentos de hordeínas e glutelinas

Segundo Sheehan e Skerritt (1997), na fracção do mosto que contém a maior parte dos polipeptídeos (64% de polipeptídeos, a maioria com um peso molecular inferior a 8600) existe uma significativa contribuição de fragmentos de hordeínas. Ainda no mosto, os polipeptídeos derivados das hordeínas, com um peso molecular superior a 8600, constituem uma pequena fracção da quantidade total dos polipeptídeos (cerca de 3%).

A caracterização, por SDS-PAGE, de polipeptídeos (existentes na cerveja) derivados das hordeínas é complicada, devido à presença de um grande grupo de bandas, com diversos pesos moleculares (Sheehan e Skerritt, 1997).

Os polipeptídeos derivados das hordeínas são susceptíveis tanto à proteólise como à desnaturação. A sequência particular do polipeptídeo, ou a região da estrutura da hordeína de onde deriva o fragmento, é determinante no seu papel como estabilizador da espuma ou como interveniente na turvação da cerveja (Sheehan e Skerritt, 1997).

Vários autores sugerem que os polipeptídeos derivados da fragmentação de hordeínas e glutelinas (proteínas de armazenamento) têm influência na espuma da cerveja. Segundo Bamforth e Kanauchi (2003), os polipeptídeos derivados das hordeínas desempenham um papel importante na estabilização da espuma de cervejas com maior quantidade de álcool. Por outro lado, a partir de estudos de misturas de hidrolisados de hordeínas e albuminas, verificou-se que a presença de pequenas quantidades de hordeínas hidrolisadas pode ter um efeito nefasto na estabilidade da espuma proporcionada por soluções de albuminas (Bamforth e Milani, 2004).

Sørensen *et al.* (1993) propuseram que alguns fragmentos de hordeínas e glutelinas, além de estabilizadores, funcionam como promotores de formação de espuma. Mais recentemente, foram descritos fragmentos de hordeína, ricos em cisteína, que são transformados em promotores de espuma durante as fases de brassagem e de ebulição do mosto (Vaag *et al.*, 1999) e outros, ricos em prolina, com cerca de 15 a 32 kDa, que estão envolvidos na formação de turvação na cerveja (Leiper *et al.*, 2003).



Sheehan e Skeritt (1997) referiram ainda que certos polipeptídeos derivados das hordeínas são sensíveis às proteases e são significativamente afectados pelas condições da fase da brassagem. Por outro lado, parece existir uma acumulação de polipeptídeos na espuma da cerveja (com pesos moleculares entre 8000 e 18000), no decurso do envelhecimento da mesma, que influenciam, positivamente, as propriedades visco-elásticas de filmes proteicos compostos por proteína Z (Douma *et al.*, 1997).

### **1.3.5 Albuminas**

As albuminas da cevada são extraídas em solução aquosa e apresentam, no seu estado nativo, uma capacidade estabilizadora de espuma ligeiramente superior à das hordeínas. Esta diferença torna-se ainda mais pronunciada após desnaturação, especialmente se esta for induzida pelo calor. A desnaturação das albuminas leva, também, a um aumento na hidrofobicidade (Kapp e Bamforth, 2002).

A superior capacidade das albuminas (em relação às hordeínas) para estabilizar a espuma da cerveja reflecte, provavelmente, uma maior elasticidade e flexibilidade das suas moléculas. Esta capacidade é aumentada na presença de iso- $\alpha$ -ácidos derivados do lúpulo. Quando sujeita a proteólise por tripsina ou protease A, a fracção proteica das albuminas perde a capacidade de estabilização de espuma. Tem, no entanto, a capacidade de resistir à proteólise efectuada pelas cisteíno-proteases (Kapp e Bamforth, 2002).

### **1.3.6 Proteases**

As proteases da cevada em germinação são responsáveis pela degradação das proteínas de armazenamento, existentes no endosperma. Estas proteínas, de elevados pesos moleculares e geralmente insolúveis, são degradadas em polipeptídeos, peptídeos e aminoácidos solúveis (Davy *et al.*, 1998; Davy *et al.*, 2000; Kihara *et al.*, 2002). Adicionalmente, são responsáveis



pela activação de enzimas importantes, como é o caso da  $\beta$ -amilase (Osman *et al.*, 2002).

As endoproteases (EP) do malte são muito resistentes à etapa da secagem, realizada durante a maltagem. Têm ainda a capacidade de se manterem activas ao longo da brassagem, que é realizada durante o processamento da cerveja. Utilizando as hordeínas como substrato, o pH óptimo de actividade das endoproteases é 4 e a temperatura óptima é 40°C (Osman *et al.*, 2002).

Entre as endoproteases, o grupo das cisteíno-proteases é considerado o mais importante, representando mais de 90% da actividade proteolítica total. Várias cisteíno-proteases foram já purificadas e demonstraram serem capazes de hidrolisar as hordeínas dos grãos de cevada. A EP-A, a EP-B e a aleuráina são exemplos de cisteíno-proteases purificadas a partir da cevada germinada (Kihara *et al.*, 2002). A EP-A e a EP-B são proteases similares (apresentam 66% de identidade na sequência de aminoácidos), embora demonstrem diferenças na especificidade de substrato (Davy *et al.*, 1998). Segundo Kihara *et al.* (2002), um grupo de cisteíno-proteases da cevada, com 22-25 kDa, degrada as proteínas de armazenamento do grão, desempenhando um papel importante na qualidade de maltagem.

### **1.3.7 Proteínas provenientes de cereais não maltados**

Além da cevada, outros cereais são, por vezes, utilizados na produção da cerveja. Estas matérias-primas contêm proteínas de armazenamento, pertencentes à superfamília das prolaminas, como as gluteninas (trigo), gliadinas (trigo), secalinas (centeio) e zeínas (milho) (Rumbo *et al.*, 2002; Shewry e Halford, 2002), que poderão, eventualmente, aparecer no produto final.

Por sua vez, as puroindolinas são proteínas provenientes do trigo que têm a capacidade de se ligarem aos lípidos livres. A adição destas proteínas exógenas, à cerveja, atenua o efeito negativo dos lípidos sobre a espuma da mesma (Clark *et al.*, 1994; Cooper *et al.*, 2002).

## 1.4 Outros constituintes da cerveja

Para além das proteínas e dos polipeptídeos, a cerveja é constituída por diversos constituintes, com diferentes origens e características. Na Tabela 2 são resumidas algumas características desses compostos.

**Tabela 2** – Origens e principais características dos constituintes da cerveja.

Constituinte	Origem	Características
Iso- $\alpha$ -ácidos (isohumulonas)	Humulonas do lúpulo	<p>Iso-<math>\alpha</math>-ácidos principais: isómeros cis- e trans- de isohumulona, isocohumulona e isoadhumulona (Hughes, 1996). São produtos de isomerização dos <math>\alpha</math>-ácidos do lúpulo (Hughes e Baxter, 2001b).</p> <p>Moléculas anfipáticas (Hughes, 1999). Responsáveis pelo amargor da cerveja; papel importante na avaliação sensorial (Hughes e Baxter, 2001a).</p> <p>Torna a cerveja mais resistente ao ataque microbiológico (Hughes e Baxter, 2001c).</p> <p>Interacção com polipeptídeos – estabilização da espuma da cerveja (Bamforth <i>et al.</i>, 1993; Bamforth e Kanauchi, 2003).</p> <p>Quantidades típicas na cerveja: 10-60 mg/L (Hughes e Baxter, 2001b).</p>
Iões	Água; malte; cereais não maltados; lúpulo	<p>Podem ser responsáveis pela deterioração do "flavour" (Hughes e Baxter, 2001a).</p> <p>Atribuem um carácter específico à cerveja (Hughes e Baxter, 2001c).</p> <p>Catiões metálicos: estabilizadores da espuma da cerveja (Hughes, 1999; Bamforth e Kanauchi, 2003). Potencial toxicidade (Evans <i>et al.</i>, 1999a).</p> <p>Quantidades típicas na cerveja (mg/L): Potássio – 200-450; Sódio – 20-350; Cálcio – 25-120; Magnésio – 50-90; Cloreto – 120-500; Sulfato – 100-430; Oxalato – 5-30; Fosfato – 170-600; Nitrato – 0,5-2 (Hughes e Baxter, 2001b).</p>
$\beta$ -glucanos e arabinosilanos	Malte	<p>Polissacarídeos de alto peso molecular (Han, 2000).</p> <p>Suficientemente degradados em glucanos solúveis, são uma fonte de fibra alimentar. A cerveja contém entre 0,3 e 1 g/100 ml de fibra (Hughes e Baxter, 2001c).</p> <p>Aumentam a viscosidade da cerveja (Lusk <i>et al.</i>, 1995; Evans <i>et al.</i>, 1999a; Evans <i>et al.</i>, 1999b).</p> <p>Dificultam a etapa de filtração da cerveja (Han, 2000; Evans e Sheehan, 2002).</p>
Outros hidratos de carbono	Malte; cereais não maltados	<p>Importantes para o corpo e a doçura da cerveja (Hughes e Baxter, 2001b; Nogueira <i>et al.</i>, 2005).</p> <p>Compostos polares. Não estabilizadores da espuma, por si só, aumentam a viscosidade da cerveja (Hughes e Baxter, 2001a).</p> <p>Quantidade total na cerveja: 2-3 g/100ml (Hughes e Baxter, 2001c).</p> <p>Quantidades individuais encontradas na cerveja (g/L): Frutose – 0-0,19; Glucose – 0,04-1,1; Sacarose – 0-3,3; Maltose – 0,7-3,0; Maltotriose – 0,4-3,4 (Hughes e Baxter, 2001b).</p>



(Continuação)

Aminoácidos	Malte	<p>Maioria dos aminoácidos são utilizados pela levedura durante a fermentação (Hughes e Baxter, 2001c).</p> <p>Aminoácidos básicos: apresentam efeito negativo na capacidade de adesão da espuma da cerveja (Furukubo <i>et al.</i>, 1993).</p> <p>Constituem cerca de 5-11% do material azotado da cerveja (Hughes e Baxter 2001c).</p>
Melanoidinas	Resultam da interacção química entre aminoácidos e açúcares	<p>Substâncias carregadas, formadas a partir da interacção química entre aminoácidos e açúcares (Bamforth, 1985).</p> <p>Produzidas, em grande parte, na etapa de secagem (maltagem) dos grãos de cevada (Bamforth, 1985).</p> <p>Estabilizadores da espuma da cerveja (Lusk <i>et al.</i>, 1995).</p>
Ácidos orgânicos	Levedura – Fermentação	<p>Fermentações rápidas: maior quantidade destes compostos (Hughes e Baxter, 2001b).</p> <p>Contribuem para o “flavour” da cerveja (Hughes e Baxter, 2001b).</p> <p>Responsáveis pela acidez da cerveja (pH típico da cerveja: 3,9-4,4);</p> <p>Quantidades típicas na cerveja (mg/L): Acético – 30-200; Propanóico – 1-5; Butanóico – 0,5-1,5; 2-metilpropanóico – 0,1-2; Pentanóico – 0,03-0,1; 2-metilbutanóico – 0,1-0,5; 3-metilbutanóico – 0,1-2; Octanóico – 2-12; Láctico – 20-80; Pirúvico – 15-150; Succínico – 16-140 (Hughes e Baxter, 2001b).</p>
Lípidos	Malte; lúpulo; levedura	<p>Eliminados durante a produção da cerveja (Anness e Reed, 1985a; Anness e Reed, 1985b) e utilizados pela levedura para o seu crescimento (Hughes e Baxter, 2001c).</p> <p>Influência negativa sobre o “flavour” da cerveja (Anness e Reed, 1985b; Hughes e Baxter, 2001c).</p> <p>Influência negativa sobre a espuma (Roberts <i>et al.</i>, 1978; Hughes e Baxter, 2001c).</p> <p>O malte contém aproximadamente 3% de lípidos, na forma de triglicerídeos (Hughes e Baxter, 2001c).</p>
Etanol	Levedura – Fermentação	<p>Contribui directamente no “flavour” (Hughes e Baxter, 2001b).</p> <p>Aumenta a viscosidade da cerveja (Hughes e Baxter, 2001a).</p> <p>Torna a cerveja mais resistente ao ataque microbiológico (Hughes e Baxter, 2001d).</p> <p>Quantidades típicas na cerveja: 3-6% (v/v) – 0,5-1 M (Hughes e Baxter, 2001b).</p>
Polifenóis	Lúpulo	<p>Responsáveis por adstringência (Hughes e Baxter, 2001a).</p> <p>Interacção com proteínas – envolvidos no processo de turvação da cerveja (Dale <i>et al.</i>, 1989; Bamforth, 1999).</p>
Flavonóides	Resina dura do lúpulo	<p>Propriedades anticancerígenas (Wilson <i>et al.</i>, 1999).</p> <p>Estabilizadores da espuma (Wilson <i>et al.</i>, 1999).</p>
Vitaminas	Malte	<p>Cerveja: fonte importante de vitaminas do complexo B (Hughes e Baxter, 2001c).</p>
Ésteres	Levedura	<p>Factores que promovem a produção de levedura diminuem a produção de ésteres e vice-versa (Hughes e Baxter, 2001b).</p> <p>Compostos muito activos no “flavour” da cerveja (Hughes e Baxter, 2001b).</p> <p>Quantidades típicas na cerveja (mg/L): Acetato de etilo – 10-60; Acetato de isoamilo – 0,5-5; Hexanoato de etilo – 0,1-0,5; Octanoato de etilo – 0,1-1,5; Acetato de 2-feniletilo – 0,05-2; Nicotinato de etilo – 1-1,5 (Hughes e Baxter, 2001b).</p>

(Continuação)

$\alpha$ -dicetonas (Dicetonas vicinais)	Levedura	<p>Remoção destes compostos depende da regulação da fermentação (Hughes e Baxter, 2001b).</p> <p>Contribuição negativa no "flavour" da cerveja (Hughes e Baxter, 2001b).</p> <p>Diacetilo (2,3-butanodiona) – atribui um sabor desagradável de manteiga rançada (Hughes e Baxter, 2001b).</p> <p>Quantidades típicas na cerveja (mg/L): 2,3-butanodiona – 0,01-0,4; 3-hidroxi-2-butanona – 1-10; 2,3-butanodiol – 50-150; 2,3-pentanodiona – 0,01-0,15; 3-hidroxi-2-pentanona – 0,05-0,07 (Hughes e Baxter, 2001b).</p>
Dióxido de carbono	Levedura – Fermentação; adição tecnológica	<p>Papel importante na percepção sensorial da cerveja (Hughes e Baxter, 2001b).</p> <p>Torna a cerveja mais resistente ao ataque microbiológico (Hughes e Baxter, 2001d).</p> <p>Essencial na formação da espuma (Bamforth, 1985; Ronteltap <i>et al.</i>, 1991).</p> <p>Quantidade na cerveja: 23 mM a mais de 114 mM (Hughes e Baxter, 2001b).</p>
Alginato de propilenoglicol	Adição tecnológica	<p>Aditivo muito utilizado na estabilização da espuma – aumenta a hidrofobicidade dos polipeptídeos (Bamforth, 1995).</p> <p>Pode causar turvação da cerveja (Evans e Sheehan, 2002).</p>



## 1.5 Relação entre hordeínas e qualidade de maltagem

As características de uma variedade de cevada com boas qualidades de maltagem são bastante diferentes das características das variedades de cevada utilizadas na alimentação. É assim interessante conhecer os determinantes da qualidade de maltagem ao nível molecular, de modo a melhorar a avaliação de novas variedades. A qualidade da cevada para a maltagem é determinada, em parte, pelas proteínas produzidas durante o desenvolvimento da semente (Finnie *et al.*, 2002).

Extracções de hordeínas realizadas em amostras de cevadas e dos respectivos maltes demonstram diferenças quantitativas no conteúdo destas proteínas, sendo maior a sua quantidade na cevada, indicando a existência de alterações durante a maltagem. Neste processo, as hordeínas são inicialmente degradadas por endoproteases, originando peptídeos que são degradados por exopeptidases em aminoácidos (Fox *et al.*, 2002).

Muitos estudos foram realizados com o objectivo de correlacionar hordeínas individuais com a qualidade de maltagem de uma cevada, contudo, o papel das hordeínas na qualidade de maltagem não está ainda completamente esclarecido (Brennan *et al.*, 1998; Fox *et al.*, 2002). Peltonen *et al.* (1994) sugeriram que a fracção B influenciava positivamente a qualidade de maltagem. Estes investigadores sugeriram ainda que, na presença de condições ambientais que favoreçam uma alta eficiência de incorporação de azoto, a hordeína D forma múltiplas ligações dissulfureto intercadeias, diminuindo assim a qualidade de maltagem. Especularam assim que cultivares com menor conteúdo de azoto nos grãos e uma menor razão hordeína D:B, significavam boa qualidade de maltagem.

Howard *et al.* (1996), por sua vez, defendem a utilização da quantificação da hordeína D como método de determinação da qualidade de maltagem de diferentes variedades de cevada. Segundo estes investigadores, existe uma correlação negativa entre a presença desta proteína e a qualidade de maltagem. No entanto, Brennan *et al.* (1998) não encontraram dados que apoiassem esta hipótese.

Molina-Cano *et al.* (2002a) demonstraram que a quantidade e a distribuição das hordeínas B influenciam a incorporação de água nos grãos de cevada durante a maltagem. Grãos de cevada que contenham maior quantidade de hordeínas B incorporarão menor quantidade de água durante a maltagem.

Echart-Almeida e Cavalli-Molina (2001) sugerem que o estudo comparativo dos perfis electroforéticos das hordeínas pode ser considerado um método adequado para determinar a qualidade de maltagem de diferentes variedades de cevada. Concluíram ainda que a presença de três bandas específicas de hordeína se correlacionava negativamente com a qualidade de maltagem. No entanto, segundo Tsuchiya *et al.* (1995), é importante ter em conta que os padrões de hordeínas podem variar com as condições de cultivo da cevada. Para estes investigadores, os métodos de identificação baseados na análise de proteínas não são aplicáveis à cevada maltada, uma vez que ocorrem proteólises durante o processo de maltagem.

Como referido anteriormente (ver ponto 1.3.3), as hordeínas podem existir na forma de monómeros ou de agregados, constituídos por hordeínas B e D ligadas por ligações dissulfureto. Segundo Sheehan e Skeritt (1997), as variedades que contenham maiores quantidades de hordeínas na forma de agregados apresentam pior qualidade de maltagem.



## **1.6 Métodos analíticos utilizados no estudo das proteínas e dos polipeptídeos do malte, do mosto e da cerveja**

### **1.6.1 Métodos cromatográficos**

Os métodos cromatográficos são frequentemente utilizados na separação e na purificação de proteínas e polipeptídeos da cevada e da cerveja. Esta separação de proteínas e polipeptídeos pode ser obtida por diferentes tipos de cromatografia: de interações hidrofóbicas (HIC) (Slack e Bamforth, 1983; Yokoi *et al.*, 1989; Gibson *et al.*, 1995; Mills *et al.*, 1998; Hughes *et al.*, 1999; Cooper *et al.*, 2002), de filtração em gel (Asano e Hashimoto, 1980; Hejgaard e Kaersgaard, 1983; Lusk *et al.*, 1987; Dale e Young, 1987; Sørensen *et al.*, 1993; Jones e Marinac, 1997; Lusk *et al.*, 1999; Jégou *et al.*, 2000; Osman *et al.*, 2003), de troca iónica (Hejgaard e Kaersgaard, 1983, Yokoi *et al.*, 1989; Sørensen *et al.*, 1993, Bech *et al.*, 1995, Lusk *et al.*, 1995, Jones e Marinac, 1997, Jégou *et al.*, 2000) e de afinidade, utilizando diferentes ligandos, como são exemplos a concanavalina A (Kaersgaard e Hejgaard, 1979; Asano e Hashimoto, 1980; Kristoffersen e Flengsrud, 2000) ou anticorpos específicos para determinados polipeptídeos (Hollemans e Tonies, 1989; Vaag *et al.*, 1999).

A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) tem sido aplicada com benefícios inquestionáveis no estudo de proteínas e pode ser considerada uma evolução dos métodos cromatográficos mais tradicionais. O método de HPLC em fase reversa (RP-HPLC) foi utilizado no estudo da composição em hordeínas de diferentes cultivares de cevada (Schmitt *et al.*, 1989) e na separação de polipeptídeos da espuma da cerveja (Lusk *et al.*, 1995). Alguns investigadores aplicaram esta metodologia tanto na purificação da forma da LTP1 da cevada (Jones e Marinac, 1997; Jégou *et al.*, 2000) como da forma existente na cerveja (Jégou *et al.*, 2000). A HPLC por filtração em gel, por sua

vez, foi utilizada tanto na purificação da proteína Z (Holleman e Tonies, 1989; Lusk *et al.*, 1999) como na purificação da LTP1 da cerveja (Jones e Marinac, 1997). Na Tabela 3 são resumidos alguns exemplos da aplicação dos métodos cromatográficos no estudo das proteínas e dos polipeptídeos do malte, do mosto e da cerveja.

**Tabela 3** – Exemplos da aplicação dos métodos cromatográficos no estudo das proteínas e dos polipeptídeos de cevadas/maltes, mostos e cervejas.

Método	Aplicação	Referências
Cromatografia de interações hidrofóbicas (HIC)	Separação de proteínas e de polipeptídeos de cevadas/maltes, mostos e cervejas	Slack e Bamforth, 1983; Yokoi <i>et al.</i> , 1989; Gibson <i>et al.</i> , 1995; Mills <i>et al.</i> , 1998; Hughes <i>et al.</i> , 1999; Cooper <i>et al.</i> , 2002
Cromatografia por filtração em gel	<p>Separação de proteínas e de polipeptídeos de cevadas/maltes, mostos e cervejas</p> <p>Avaliação do peso molecular de determinadas frações polipeptídicas de cervejas</p>	<p>Hejgaard e Kaersgaard, 1983; Dale e Young, 1987; Sørensen <i>et al.</i>, 1993; Jones e Marinac, 1997; Lusk <i>et al.</i>, 1999; Jégou <i>et al.</i>, 2000; Osman <i>et al.</i>, 2003</p> <p>Asano e Hashimoto, 1980; Lusk <i>et al.</i>, 1987</p>
Cromatografia de troca iônica	<p>Separação de polipeptídeos de cervejas</p> <p>Purificação de proteína Z e de LTP1</p>	<p>Yokoi <i>et al.</i>, 1989 ; Lusk <i>et al.</i>, 1995</p> <p>Hejgaard e Kaersgaard, 1983; Sørensen <i>et al.</i>, 1993; Bech <i>et al.</i>, 1995; Jones e Marinac, 1997</p>
Cromatografia de afinidade	<p>Separação de polipeptídeos de cervejas</p> <p>Remoção da proteína Z da cerveja</p>	<p>Kaersgaard e Hejgaard, 1979; Asano e Hashimoto, 1980; Vaag <i>et al.</i>, 1999</p> <p>Holleman e Tonies, 1989</p>
HPLC	<p>Separação de proteínas e de polipeptídeos de cevadas/maltes, mostos e cervejas</p> <p>Purificação de proteína Z e LTP1</p>	<p>Schmitt <i>et al.</i>, 1989; Lusk <i>et al.</i>, 1995; Lookhart <i>et al.</i>, 1999; Molina-Cano <i>et al.</i>, 2002b</p> <p>Holleman e Tonies, 1989; Jones e Marinac, 1997; Lusk <i>et al.</i>, 1999; Jégou <i>et al.</i>, 2000</p>

### 1.6.2 Métodos electroforéticos

Os métodos electroforéticos têm sido muito utilizados no estudo das proteínas e dos polipeptídeos do malte, do mosto e da cerveja.



A electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) foi aplicada por diversos investigadores no estudo das hordeínas de amostras de cevada, com o objectivo de identificar diferentes cultivares e de determinar a sua qualidade de maltagem (Villiers e Laubscher, 1989; Peltonen *et al.*, 1994; Howard *et al.*, 1996; Brennan *et al.*, 1998; Echart-Almeida e Cavalli-Molina, 2001; Molina-Cano *et al.*, 2001). Neste tipo de amostras, a SDS-PAGE foi ainda utilizada para comprovar a inexistência de proteínas específicas em determinadas variedades (Gibson *et al.*, 1995). Kapp e Bamforth (2002) utilizaram este método electroforético para avaliar o impacto de proteólises controladas, escolhidas de forma a simular os efeitos da maltagem e do fabrico da cerveja, em albuminas e hordeínas isoladas da cevada.

Uma vez que a SDS-PAGE separa as proteínas segundo o seu peso molecular, é muitas vezes utilizada na caracterização dos polipeptídeos da cerveja (Curioni *et al.*, 1995; Sheehan e Skeritt, 1997; Mills *et al.*, 1998; Cooper *et al.*, 2002; Osman *et al.*, 2003; Leiper *et al.*, 2003), da espuma (Lusk *et al.*, 1995; Bech *et al.*, 1995; Douma *et al.*, 1997; Vaag *et al.*, 1999; Leiper *et al.*, 2003), assim como dos seus precursores da cevada e do malte (Schmitt *et al.*, 1989). A caracterização destas biomoléculas pode ainda ser complementada com a determinação dos pontos isoeléctricos, utilizando a focagem isoeléctrica (IEF) (Asano e Hashimoto, 1980; Lusk *et al.*, 1987; Yokoi *et al.*, 1989).

A electroforese bidimensional (2D-PAGE) é uma metodologia que associa as vantagens da IEF às da SDS-PAGE e que também foi utilizada na purificação, identificação e/ou caracterização das proteínas e polipeptídeos da cevada e da cerveja (Curioni *et al.*, 1995; Jones e Marinac, 1997; Kristoffersen e Flengsrud, 2000; Finnie *et al.*, 2002; Borén *et al.*, 2004; Østergaard *et al.*, 2004). Foi ainda aplicada no estudo proteómico de diferentes cevadas e maltes, para determinar a sua qualidade de maltagem (Østergaard *et al.*, 2002).

Por sua vez, a electroforese capilar foi aplicada na separação e caracterização de hordeínas (Lookhart *et al.*, 1999) e no estudo das alterações sofridas pela LTP1 e pela proteína Z ao longo do processo de produção de cerveja (Lusk *et al.*, 1999).

Na Tabela 4 são apresentados exemplos da utilização de métodos electroforéticos no estudo das amostras anteriormente referidas.

**Tabela 4** – Exemplos da aplicação dos métodos electroforéticos no estudo das proteínas e dos polipeptídeos de cevadas/maltes, mostos e cervejas.

Método	Aplicação	Referências
Electroforese com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)	Identificação de cultivares e determinação de qualidade de maltagem de cevadas	Villiers e Laubscher, 1989; Howard <i>et al.</i> , 1996; Molina-Cano <i>et al.</i> , 2001
	Separação e caracterização de proteínas e polipeptídeos de cevadas/maltes, mostos e cervejas (Determinação de pesos moleculares)	Schmitt <i>et al.</i> , 1989; Peltonen <i>et al.</i> , 1994; Lusk <i>et al.</i> , 1995; Bech <i>et al.</i> , 1995; Curioni <i>et al.</i> , 1995; Sheehan e Skerritt, 1997; Douma <i>et al.</i> , 1997; Mills <i>et al.</i> , 1998; Vaag <i>et al.</i> , 1999; Cooper <i>et al.</i> , 2002; Kapp e Bamforth, 2002; Osman <i>et al.</i> , 2003; Leiper <i>et al.</i> , 2003
	Comprovação da inexistência de uma proteína específica numa variedade de malte	Gibson <i>et al.</i> , 1995
Focagem Isoeléctrica	Separação e caracterização de polipeptídeos de cervejas (Determinação de pontos isoeléctricos)	Asano e Hashimoto, 1980; Lusk <i>et al.</i> , 1987; Yokoi <i>et al.</i> , 1989
Electroforese Bidimensional (2D-Page)	Determinação da qualidade de maltagem de cevadas	Østergaard <i>et al.</i> , 2002
	Purificação, identificação e/ou caracterização de proteínas e polipeptídeos de cevadas/maltes, mostos e cervejas	Curioni <i>et al.</i> , 1995; Jones e Marinac, 1997; Kristoffersen e Flengsrud, 2000; Finnie <i>et al.</i> , 2002; Borén <i>et al.</i> , 2004; Østergaard <i>et al.</i> , 2004
Electroforese capilar	Separação e caracterização de hordeínas	Lookhart <i>et al.</i> , 1999
	Quantificação de proteína Z e fLTP	Lusk <i>et al.</i> , 1999

### 1.6.3 Métodos imunológicos

O método ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) é talvez o método imunológico mais utilizado no estudo das proteínas e dos polipeptídeos do malte, do mosto e da cerveja. Este método tem sido utilizado na quantificação de polipeptídeos promotores de espuma (proteína Z4, proteína Z7 e/ou LTP1) (Holleman e Tonies, 1989; Gibson *et al.*, 1995; Bech *et al.*, 1995; Ishibashi *et al.*, 1996; Ishibashi *et al.*, 1997; Onishi *et al.*, 1999; Evans *et*



*al.*, 1999a; Evans *et al.*, 1999b; Nierop *et al.*, 2004), de polipeptídeos envolvidos no processo de turvação da cerveja (Ishibashi *et al.*, 1996; Ishibashi *et al.*, 1997) e de outros polipeptídeos específicos, como é o caso de um referido por Vaag *et al.* (1999), com um peso molecular de 17000. O método ELISA foi também utilizado para testar outros testes imunoquímicos aplicados no estudo destes polipeptídeos (Evans *et al.*, 2001) e para caracterizar anticorpos quanto à sua ligação a fracções proteicas específicas (Mills *et al.*, 1998). Onishi *et al.* (1999) referiram que o alginato de propilenoglicol (PGA) (aditivo utilizado para melhorar a estabilidade da espuma), por vezes utilizado durante a produção da cerveja, pode interferir na ligação de anticorpos monoclonais a determinados polipeptídeos.

Outro método imunológico bastante utilizado é o “western blot”, que tem sido aplicado no estudo de polipeptídeos da espuma da cerveja (Mohan *et al.*, 1992; Mohan *et al.*, 1993) e de polipeptídeos específicos, como a proteína Z da cerveja, e os seus precursores na cevada (Curioni *et al.*, 1995; Gibson *et al.*, 1995), ou a LTP1 (Sørensen *et al.*, 1993, Bech *et al.*, 1995). Mills *et al.* (1998) utilizaram este método para testar a eficiência de um painel de 15 anticorpos monoclonais específicos para uma fracção polipeptídica da cerveja.

A imuno-electroforese, que é um método que combina as vantagens das técnicas imunológicas com as das electroforéticas, foi utilizada por Asano e Hashimoto (1980) para estudar a origem de polipeptídeos da cerveja relacionados com a sua espuma. Hejgaard e Kaersgaard (1983), por outro lado, utilizaram a rocket imuno-electroforese, uma das variantes dos métodos imuno-electroforéticos, na quantificação da proteína Z existente na cerveja e Hollemans e Tonies (1989) aplicaram-na na avaliação da eficiência de um método de remoção da mesma proteína Z, da espuma da cerveja. A imuno-electroforese cruzada, outra das variantes dos métodos imuno-electroforéticos, foi utilizada por Sørensen *et al.* (1993) na detecção da proteína Z.

Na Tabela 5 são resumidos alguns exemplos da aplicação de métodos imunológicos no estudo das proteínas e dos polipeptídeos existentes em amostras de malte, mosto e cerveja.

**Tabela 5** – Exemplos da aplicação dos métodos imunológicos no estudo das proteínas e dos polipeptídeos de cevadas/maltes, mostos e cervejas.

Método	Aplicação	Referências
ELISA	Quantificação de proteínas e polipeptídeos de cevadas/maltes, mostos e cervejas	Gibson <i>et al.</i> , 1995; Bech <i>et al.</i> , 1995; Ishibashi <i>et al.</i> , 1996; Ishibashi <i>et al.</i> , 1997; Sheehan e Skerritt, 1997; Onishi <i>et al.</i> , 1999; Evans <i>et al.</i> , 1999a; Evans <i>et al.</i> , 1999b; Vaag <i>et al.</i> , 1999; Hughes <i>et al.</i> , 1999; Nierop <i>et al.</i> , 2004
	Avaliação da eficiência de um método de remoção da proteína Z da cerveja	Hollemans e Tonies, 1989
	Averiguação da eficiência de outros testes imunoquímicos	Evans <i>et al.</i> , 2001
	Caracterização de anticorpos quanto à sua ligação a determinadas fracções proteicas	Mills <i>et al.</i> , 1998
Western Blot	Deteção de proteínas e polipeptídeos de cevadas/maltes, mostos e cervejas	Mohan <i>et al.</i> , 1992; Sørensen <i>et al.</i> , 1993; Mohan <i>et al.</i> , 1993; Gibson <i>et al.</i> , 1995; Curioni <i>et al.</i> , 1995; Bech <i>et al.</i> , 1995; Sheehan e Skerritt, 1997; Vaag <i>et al.</i> , 1999
	Averiguação da eficiência de anticorpos monoclonais específicos para uma fracção polipeptídica da cerveja	Mills <i>et al.</i> , 1998
Imunoelectroforeses	Deteção de polipeptídeos da cerveja	Asano e Hashimoto, 1980; Sørensen <i>et al.</i> , 1993
Rocket Imunoelectroforese	Quantificação da proteína Z da cerveja	Hejgaard e Kaersgaard, 1983
	Avaliação da eficiência de um método de remoção da proteína Z da cerveja	Hollemans e Tonies, 1989

#### 1.6.4 Métodos de precipitação de proteínas

As proteínas podem ser precipitadas por modificações no solvente, tais como alterações de pH, de força iónica ou de temperatura. As propriedades do solvente podem também ser modificadas, pela adição de elevadas concentrações de sais ou de solventes orgânicos miscíveis.

Um dos métodos de precipitação de proteínas mais utilizado é o da adição de sulfato de amónio. Este tipo de procedimento tem sido utilizado por



alguns investigadores (Asano e Hashimoto, 1980; Slack e Bamforth, 1983; Yokoi *et al.*, 1989; Curioni *et al.*, 1995; Mills *et al.*, 1998) no estudo das proteínas da cerveja.

## 1.7 Objectivos do trabalho

As cevadas (*Hordeum vulgare* L.) Scarlett e Prestige são variedades de primavera, de duas fileiras, com boas características agrícolas. A variedade Scarlett apresenta muito boa qualidade cervejeira e é considerada uma cevada padrão, pela “European Brewery Convention” (EBC), para a região sul da Europa. Por sua vez, a variedade Prestige, com o processo de aprovação tecnológica actualmente concluído, foi introduzida em Portugal em 2003. O seu desenvolvimento no nosso país é muito promissor, sendo esperada a sua aplicação como malte de utilização geral.

Este trabalho teve como objectivo a caracterização das referidas variedades de cevada (colhidas no Alentejo em 2003), através da realização de um estudo comparativo dos perfis cromatográficos (obtidos por RP-HPLC/UV) e electroforéticos (obtidos por SDS-PAGE) das proteínas existentes nos maltes, produzidos a partir das duas variedades de cevada, e nos respectivos mostos e cervejas. O trabalho foi dividido em três etapas:

- Avaliação qualitativa e quantitativa da composição em hordeínas e albuminas (e outras proteínas solúveis) das duas variedades de malte;
- Avaliação qualitativa e quantitativa da composição em albuminas e outras proteínas solúveis dos mostos, obtidos a partir de cada uma das variedades de malte, e das respectivas cervejas;
- Correlação com as características físico-químicas e sensoriais das amostras estudadas.



## **2 Materiais e métodos**

2.1. Amostragem

2.2. Cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa

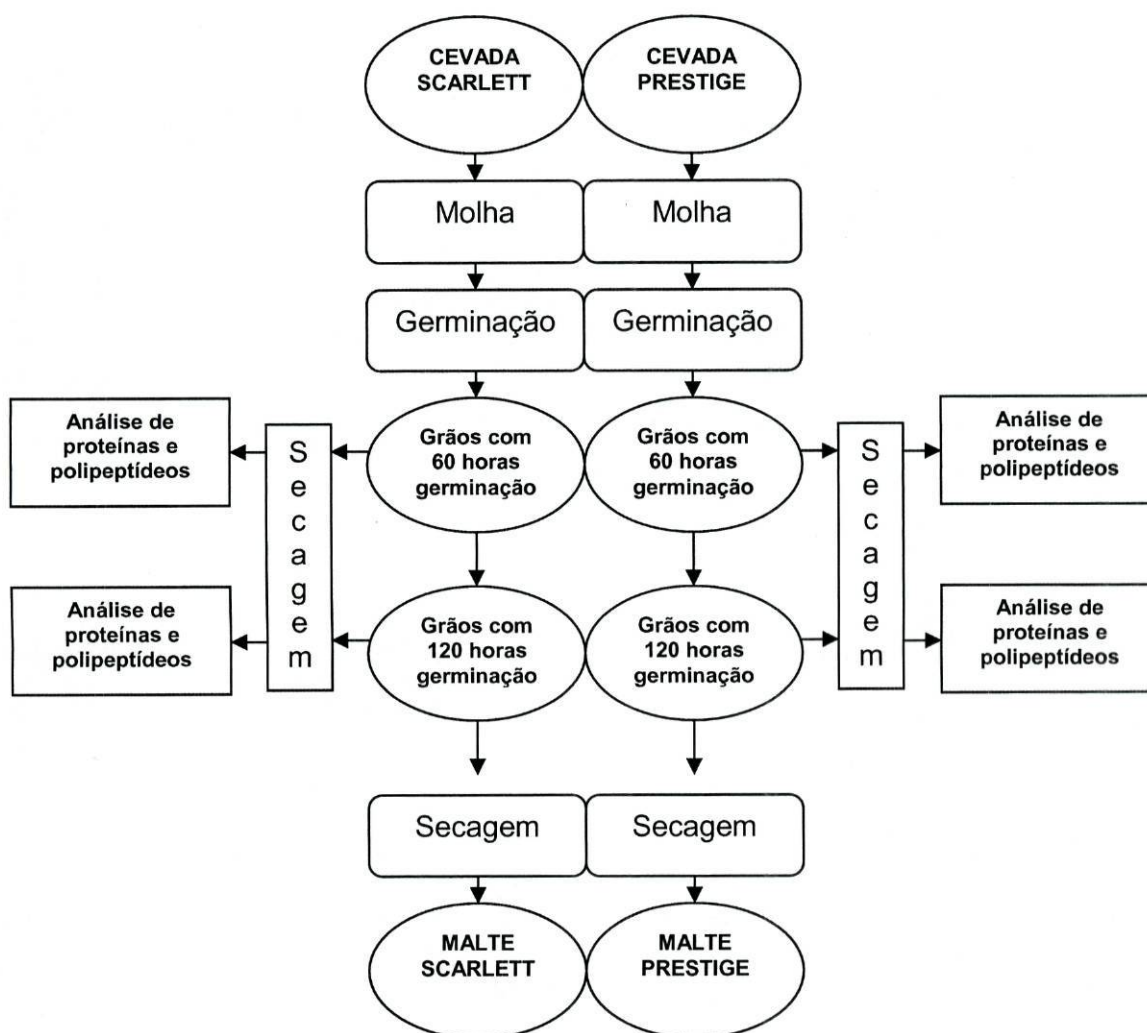
2.3. Análise estatística dos resultados obtidos por cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa

2.4. Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio

2.5. Caracterização físico-química e sensorial das amostras analisadas

## 2.1 Amostragem

Partindo das duas variedades puras de cevada nacional (*Hordeum vulgare* L. cv. Scarlett e cv. Prestige), colhidas no Alentejo em 2003, produziram-se os respectivos maltes, utilizando o mesmo diagrama de maltagem. Foram recolhidas amostras, de cada uma das variedades, com 60 e 120 horas de germinação, de acordo com a Figura 2.



**Figura 2** – Plano de amostragem durante a maltagem.

A partir dos maltes obtidos anteriormente, produziram-se cervejas (fabricos monomálticos), utilizando os mesmos métodos de brassagem, de



fermentação (com leveduras da mesma geração) e de filtração, assim como iguais condições de enchimento da cerveja (mesma linha de enchimento e mesma embalagem final). Foram recolhidas amostras de mosto frio e de cerveja, tanto do tanque de cerveja filtrada, como de cerveja cheia, de acordo com a Figura 3.

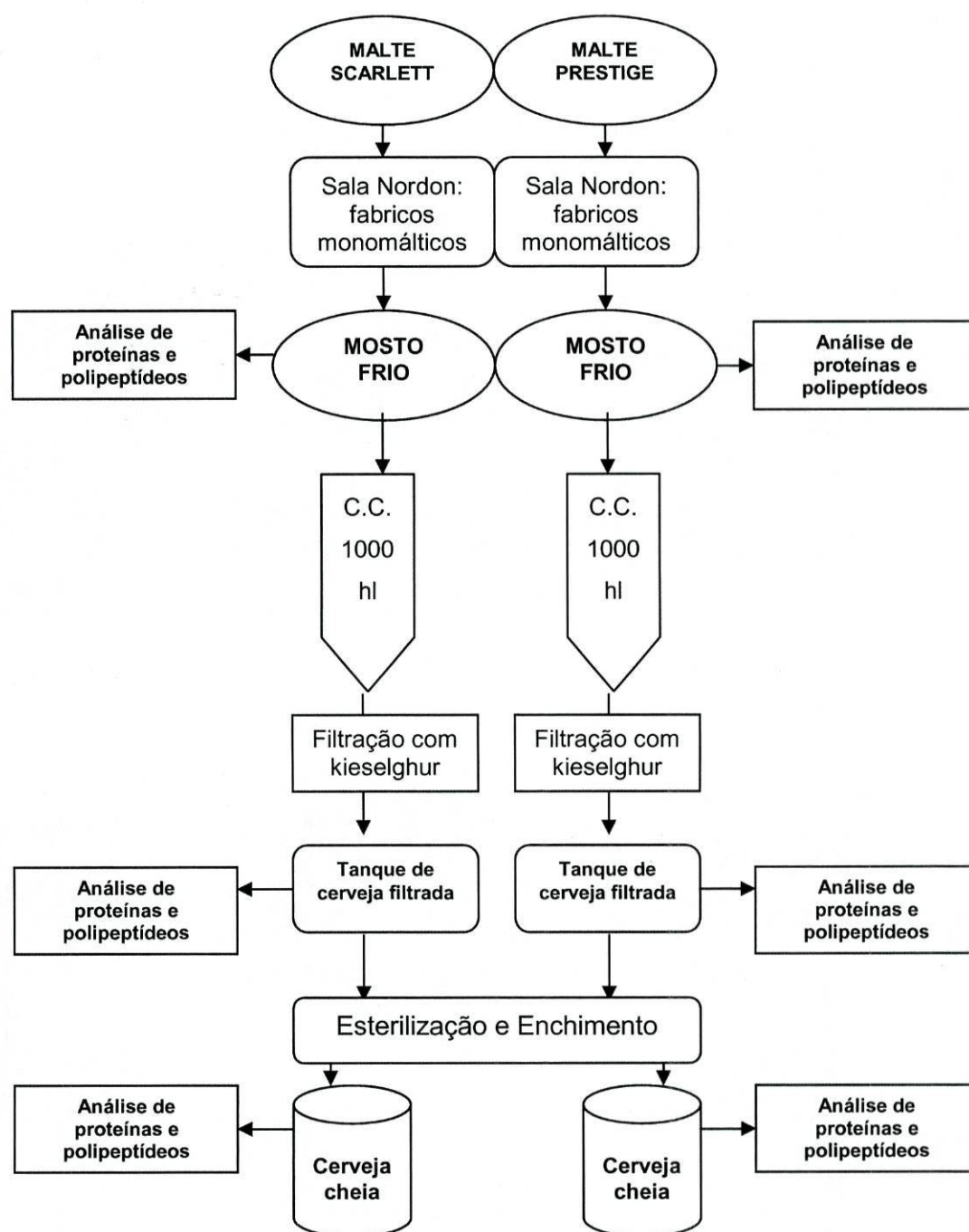


Figura 3 - Plano de amostragem durante a produção de cerveja.

Todas as amostras utilizadas foram fornecidas pela empresa cervejeira UNICER – Bebidas de Portugal SGPS, SA, Leça do Balio.

### 2.1.1 Amostras de malte

As amostras de malte utilizadas foram recolhidas com 60 e 120 horas de germinação, procedendo-se, de seguida, a uma etapa de secagem, de forma a cessar a germinação. Posteriormente, os grãos de malte foram moídos até se obter uma mistura fina de farinha e cascas.

Para se proceder à extracção das hordeínas das amostras de malte, utilizou-se um método baseado no procedimento de Schmitt *et al.* (1989). As proteínas foram extraídas durante um período de 3 horas, a partir de 1 g de malte, por 8 ml de uma solução de extracção Tris-HCl 62 mM, pH 6,8, 2% (m/v) SDS e 8% (v/v) 2-mercaptoetanol, à temperatura ambiente. O extracto obtido foi centrifugado a 5000 rpm, numa centrífuga Heraeus Sepatech – Labofuge Ae, durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, as amostras foram filtradas em filtros de seringa Teknokroma (TR-200106) de 0,45 µm, PVDF, 25 mm Ø, PK/100, divididas em alíquotas e armazenadas a -20°C, até posterior análise. Para averiguar possíveis diferenças entre extracções de hordeínas, estas foram realizadas em triplicado e em dias diferentes.

Foram ainda utilizados dois métodos de extracção das albuminas (e de outras proteínas solúveis) existentes nas amostras de malte. Num dos métodos, baseado no procedimento de Kapp e Bamforth (2002), as proteínas foram extraídas, a partir de 1g de malte, com 10 ml de cloreto de sódio 0,1 M, a 4°C, durante 10 minutos. Repetiu-se a operação mais duas vezes. Os três extractos obtidos foram reunidos e centrifugados a 750 xg, numa centrífuga Sigma 3k10, durante 12 minutos, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, as amostras foram filtradas em filtros de seringa Teknokroma (TR-200106) de 0,45 µm, PVDF, 25 mm Ø, PK/100, divididas em alíquotas e armazenadas a -20°C, até posterior análise.

No segundo método, baseado no procedimento de Howard *et al.* (1996), as proteínas foram extraídas, a partir de 1 g de malte, com 10 ml de fosfato de potássio monobásico 0,15 M, pH 8, ditiotretitol (DTT) 5 mM, à temperatura



ambiente, durante 1 hora. Repetiu-se a operação mais uma vez. Os dois extractos obtidos foram reunidos e centrifugados a 1000 xg, numa centrífuga Sigma 3k10, durante 8 minutos, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, as amostras foram filtradas, como referido no método anterior, divididas em alíquotas e armazenadas a -20°C.

### **2.1.2 Amostras de mosto e cerveja**

Todas as amostras de mosto e de cerveja foram divididas em alíquotas e congeladas a -20°C, até posterior análise. Apesar de terem sido analisadas duas amostras de mosto (obtidas a partir de fabricos independentes), para cada uma das variedades de malte, apenas se analisaram uma amostra de cerveja filtrada e uma de cerveja cheia, dado que ambos os mostos foram conjugados durante a produção das cervejas.

## **2.2 Cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa**

### **2.2.1 Padrões e reagentes**

Todas as análises cromatográficas efectuadas utilizaram dois eluentes: A – água ultrapura, obtida num sistema de purificação de água Seral – Seralpur Pro 90 CN, e B – acetonitrilo LiChrosolv (Merck). Ambos os eluentes foram adicionados com 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) (Fluka) e desgasificados sob vácuo, durante 15 minutos, à temperatura ambiente.

Foi ainda utilizada diariamente, como padrão externo, uma solução de albumina de soro bovino (BSA) a 1 mg/ml (Sigma).

### **2.2.2 Equipamento**

O sistema cromatográfico utilizado era constituído por uma bomba quaternária de baixa pressão Jasco PU-1580 Intelligent HPLC pump, acoplada a um módulo de desgasificação Jasco DG-1580-54 4-line degasser, um forno de coluna Jones Chromatography 7981 Column heater, um injector Rheodyne 7725i, um loop de 500 ou de 100 µl e um detector UV/VIS Jasco UV-970 Intelligent UV/VIS detector. A separação cromatográfica foi obtida pela utilização de uma coluna Chrompack P 300 RP, constituída por um copolímero de poliestireno e divinilbenzeno (tamanho de partículas 8 µm, de poro 300 Å, 150 x 4,6 mm de diâmetro interno), utilizada em fase reversa. Na aquisição de dados foi utilizado o software Jasco-Borwin version 1.50 para Windows. Um aparelho de ultra-sons Fungilab Ultrasonic cleaner foi utilizado na desgasificação dos eluentes.



### 2.2.3 Condições cromatográficas

A separação cromatográfica efectuou-se com um fluxo constante de eluentes de 1ml/min e uma temperatura de aquecimento da coluna de 65°C. A detecção foi efectuada a 280 nm. Foram injectados volumes de amostra de 500 µl, para os extractos de malte (tanto na separação de hordeínas como de albuminas e outras proteínas solúveis), e de 100 µl, para os mostos e as cervejas. Todas as amostras foram analisadas, pelo menos, em triplicado.

O gradiente de eluentes utilizado na separação das hordeínas (das amostras de malte), apresentado na Tabela 6, foi diferente daquele utilizado na separação das albuminas e outras proteínas solúveis (das amostras de malte, mosto e cerveja), apresentado na Tabela 7.

**Tabela 6** – Gradiente de eluentes utilizado nas separações cromatográficas de hordeínas.

Tempo / Mistura de eluente	
Inicial / 80% A – 20% B	24 min / 60% A – 40% B
3 min / 80% A – 20% B	27 min / 60% A – 40% B
6 min / 75% A – 25% B	30 min / 55% A – 45% B
9 min / 75% A – 25% B	33 min / 55% A – 45% B
12 min / 70% A – 30% B	36 min / 50% A – 50% B
15 min / 70% A – 30% B	39 min / 50% A – 50% B
18 min / 65% A – 35% B	42 min / 40% A – 60% B
21 min / 65% A – 35% B	47 min / 80% A – 20% B

**Tabela 7** – Gradiente de eluentes utilizado nas separações cromatográficas de albuminas e outras proteínas solúveis.

Tempo / Mistura de eluentes
Inicial / 95% A – 5% B
5 min / 95% A – 5% B
10 min / 90% A – 10% B
30 min / 45% A – 55% B
35 min / 95% A – 5% B

Diariamente, antes do início dos trabalhos, injectou-se uma solução padrão de BSA (500 µg para maltes e 100 µg para mostos e cervejas). O objectivo deste procedimento foi detectar e corrigir possíveis modificações no sistema cromatográfico.

#### **2.2.4 Recolha de fracções proteicas de amostras de malte**

Durante o processo de separação das albuminas e outras proteínas solúveis das amostras de malte, por RP-HPLC, recolheram-se fracções proteicas, que eluíam no intervalo 4,5–10,5 minutos. As fracções respeitantes a 13 injeções, para cada uma das amostras, foram reunidas e concentradas, utilizando um rotavapor Büchi REIII, equipado com um banho de água Büchi 461 water bath, e uma bomba de vácuo Büchi Vac V-500. De seguida, procedeu-se à quantificação do conteúdo proteico das referidas fracções, pelo micrométodo de Bradford (1976), e ao seu armazenamento a 4°C. Posteriormente, efectuou-se uma separação, por SDS-PAGE, das proteínas existentes nas fracções recolhidas.



## 2.3 Análise estatística dos resultados obtidos por cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa

Os dados obtidos a partir das separações cromatográficas foram estatisticamente analisados pelo programa SPSS 13.0 para Windows.

Relativamente às amostras de malte, realizaram-se comparações dos valores médios obtidos para cada variável por ANOVA One-Way, com teste *post-hoc* de Tukey HSD, com o objectivo de verificar se os resultados obtidos eram estatisticamente diferentes entre variedades e/ou entre tempos de germinação. Posteriormente, foram realizadas Análises de Componentes Principais (ACP), com o objectivo de discriminar as diferentes amostras de malte. Esta técnica estatística foi utilizada para simplificar os resultados obtidos, tornando-os mais facilmente interpretáveis, sem, contudo, perder o essencial da informação obtida. Com a utilização da ACP é possível agrupar amostras que apresentem semelhanças entre si e, por outro lado, separar amostras com características diferentes. Além de evidenciar as informações mais importantes, sob a forma de novas variáveis, apresenta-as em gráficos de leitura simples. No caso específico da separação das hordeínas, foi utilizado o método Varimax de rotação de variáveis, com normalização de Kaiser. Na ACP dos dados das albuminas e outras proteínas solúveis, por outro lado, não foi realizada qualquer rotação de variáveis. As variáveis utilizadas neste estudo foram as áreas dos picos obtidos pela separação por RP-HPLC, com a excepção das dos picos 1 e 2, no caso das hordeínas. Para estudar a aplicabilidade da ACP aos dados obtidos, respeitando os pressupostos associados a esta técnica estatística, foram analisados os seguintes parâmetros: normalidade (utilizando o teste Shapiro-Wilk,  $p < 0,05$ ), simetria ( $|assimetria/std.error_{assimetria}|$ ) e achatamento ( $|curtose/std.error_{curtose}|$ ) da distribuição dos dados, valor de KMO (Kaiser-Meyer-Olkin) e teste de esfericidade de Bartlett ( $p < 0,01$ ), para verificar a qualidade das correlações entre variáveis, matriz anti-imagem, que é uma medida da adequação amostral

de cada variável para a utilização da ACP, e as comunalidades, que indicam a quantidade de variância partilhada pelo menos com uma das variáveis do conjunto.

No que diz respeito aos dados obtidos com a separação das proteínas existentes nas amostras de mosto e de cerveja (filtrada e cheia), realizaram-se comparações dos valores médios obtidos para cada variável, através de testes *t* de Student. O objectivo deste procedimento foi verificar se os resultados eram estatisticamente diferentes entre amostras produzidas a partir das duas variedades estudadas. Uma das condições da aplicabilidade do teste *t* de Student é a normalidade da distribuição dos dados obtidos, que foi determinada através do teste de Shapiro-Wilk, para o intervalo de confiança de 95%.

Para comparar os resultados obtidos com a separação das proteínas existentes nas amostras de mosto e de cerveja, foi realizada uma nova ACP. As variáveis utilizadas foram as áreas dos picos **2**, **2b**, **3** e **4** de todas as amostras. As áreas dos picos **1** não foram usadas, devido a nem sempre aparecerem bem separados nas amostras de cerveja. A aplicabilidade deste método aos dados obtidos foi verificada da mesma forma que a descrita no caso das amostras de malte.

Para todas as amostras estudadas (maltes, mostos e cervejas), foi ainda determinada a dispersão dos dados obtidos para cada variável, através do cálculo dos coeficientes de variação (CV).



## **2.4 Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio**

### **2.4.1 Quantificação do conteúdo proteico pelo método de Bradford**

O conteúdo proteico de todas as amostras utilizadas em SDS-PAGE foi quantificado pelo método de Bradford (1976). Foi utilizada albumina de soro bovino (BSA) como padrão, num intervalo de 5 a 50 µg de proteína. No caso das fracções proteicas recolhidas das amostras de malte, a partir da separação cromatográfica, foi aplicado o micrométodo de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão, num intervalo de 1 a 10 µg de proteína.

Atendendo a que a presença de SDS interfere na metodologia espectrofotométrica utilizada, nas amostras de malte extraídas pelo método de Schmitt *et al.* (1989) utilizou-se, como branco, uma mistura de 10 µl da solução de extracção e 90 µl de água destilada, corrigindo a referida influência. A proporção entre solução de extracção e água destilada escolhida relaciona-se com a quantidade de amostra utilizada neste método, que foi também de 10 µl para 90 µl de água.

### **2.4.2 Padrões e reagentes**

Nas electroforeses realizadas utilizou-se uma mistura de 13 padrões de peso molecular, SigmaMarker – Wide molecular weight range (Sigma), com um intervalo de pesos moleculares entre os 6500 e os 205000. A mistura de marcadores de peso molecular escolhida pretendeu adequar-se ao leque de pesos moleculares das proteínas e dos polipeptídeos encontrados nas amostras de malte, de mosto e de cerveja. Na Tabela 8 são apresentados os

pesos moleculares das proteínas existentes na referida mistura de padrões de peso molecular.

**Tabela 8** – Pesos moleculares das proteínas existentes na mistura de padrões de SDS-PAGE.

Proteína	Peso molecular
Miosina, músculo de coelho	205000
$\beta$ -Galactosidase	116000
Fosforilase b, músculo de coelho	97000
Cinase da frutose-6-fosfato, músculo de coelho	84000
Albumina, soro bovino	66000
Desidrogenase glutâmica, fígado bovino	55000
Ovalbumina, ovo de galinha	45000
Desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato, músculo de coelho	36000
Anidrase carbónica, eritrócitos bovinos	29000
Tripsinogénio, pâncreas bovino	24000
Inibidor da tripsina, soja	20000
$\alpha$ -Lactalbumina, leite bovino	14200
Aprotinina, pulmão bovino	6500

Com o objectivo de se confirmar a posição relativa de cada um dos padrões de peso molecular, foi também utilizada, como padrão, BSA com uma pureza mínima de 98% (Sigma).

A acrilamida e a glicina foram adquiridas à Sigma-Aldrich, os reagentes bisacrilamida, azul de bromofenol, gluteraldeído e  $\beta$ -mercaptoetanol à Sigma, o N,N,N',N'-tetrametilenodiamina (TEMED) à Aldrich, o DTT, azul de Coomassie R250, azul de Coomassie G250, metanol, tris(hidroximetil)aminometano (Tris) e a agarose à Fluka, o persulfato de amónio (APS), formaldeído (a 25%), carbonato de sódio, nitrato de prata, n-butanol, glicerol, dodecilsulfato de sódio (SDS) e ácido cítrico à Merck e o ácido acético à Panreac.

### 2.4.3 Equipamento

Na quantificação do conteúdo proteico das amostras, pelo método de Bradford (1976), foi utilizado um espectrofotómetro de UV/VIS Unicam HeAios.



As electroforeses foram realizadas em tinas verticais Hoefer Scientific Instruments SE 280, com uma fonte eléctrica UniEquip Unipack 2000.

Todos os géis foram fotografados e digitalizados utilizando uma câmara UV/VIS Vilber Lourmat e o software BioCaptMW, versão 95.05s, para Windows.

#### **2.4.4 Condições electroforéticas**

As electroforeses foram realizadas de acordo com o sistema descontinuo de Laemmli (1970). Os géis (1,5 mm de espessura, 12 x 16 cm) tinham uma concentração de poliacrilamida de 5% no gel de concentração e de 12% no gel de separação. O tampão do gel de concentração era uma solução Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, 0,1% SDS, o tampão do gel de separação era uma solução Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8, 0,1% SDS e o tampão de eluição era uma solução Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, glicina 0,25 M, 0,1% SDS. As amostras foram misturadas na proporção de 1:1 (v/v) com o tampão de amostra (Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 0,02% azul de bromofenol, 10% 2-mercaptoetanol) de modo a conterem 0,5, 2, 2,5 e 4 µg de proteína, para as amostras de fracções proteicas obtidas de maltes, a partir da RP-HPLC, de malte, de cerveja e de mosto, respectivamente. O volume de mistura de padrões de peso molecular utilizado foi de 5 µl para as amostras de malte e de cerveja, 3 µl para as fracções proteicas obtidas de maltes, a partir da RP-HPLC, e 3,5 µl para as amostras de mostos. Por sua vez, a BSA, utilizada como marcador de peso molecular, foi aplicada nos géis num volume correspondente a 2 µg de proteína para as amostras de malte e cerveja e a 1 µg para as amostras de mosto. Todas as amostras, assim como a BSA, foram colocadas num banho fervente durante 3 minutos, antes de serem aplicadas no gel. A electroforese desenvolveu-se inicialmente a 25 mA, até atingir o gel de separação, e posteriormente a 35 mA, durante cerca de 2 horas. A separação foi realizada a 4°C, para contrariar o aquecimento do gel que normalmente sucede neste tipo de separações. Todas as análises foram efectuadas, pelo menos, em triplicado.

Na fixação e coloração dos géis foram testados dois métodos diferentes: azul de Coomassie R250 e nitrato de prata. Optou-se pelo método de coloração por nitrato de prata, descrito por Morrissey (1981), uma vez que demonstrou ser mais sensível, permitindo assim uma melhor visualização das diferenças entre os perfis electroforéticos das várias amostras. Este método inicia-se com uma série de três etapas, que levam à fixação do gel: adição de uma solução de metanol, ácido acético e água (50:10:40 v/v), durante 30 minutos; remoção e adição de outra solução de metanol, ácido acético e água (5:7:88 v/v), durante 30 minutos; remoção e adição de uma solução de glutaraldeído a 10%, durante 30 minutos. Terminada esta sequência, rejeita-se o glutaraldeído e procede-se à lavagem do gel, com um grande volume de água destilada. Após lavagem, procede-se à coloração, que se inicia com a adição de uma solução aquosa de DTT a 5 µg/ml, durante 30 minutos. De seguida, rejeita-se a solução de DTT e adiciona-se uma solução de nitrato de prata a 0,1%, durante 20 minutos. A solução de nitrato de prata é removida e realiza-se a revelação, obtida com a lavagem rápida do gel, com água destilada, seguida da adição de uma solução de carbonato de sódio a 3% e 0,05% de formaldeído. Quando se atinge a coloração pretendida, para-se o processo de revelação com a adição de uma solução de ácido cítrico a 2,3 M, durante 5 minutos, seguida de várias lavagens do gel com água destilada, durante 30 minutos.



## **2.5 Caracterização físico-química e sensorial das amostras analisadas**

Todas as análises físico-químicas, efectuadas nas amostras utilizadas neste estudo, foram realizadas nos laboratórios das empresas MALTIBÉRICA, SA, Poceirão e UNICER – Bebidas de Portugal SGPS, SA, Leça do Balio, de acordo com os métodos do manual Analytica-EBC (1998) da “European Brewery Convention”.

Na análise sensorial das amostras de cerveja cheia, as amostras foram submetidas a dois tipos de prova: um controlo organoléptico e uma descrição do perfil aromático. O “score” para o controlo organoléptico baseou-se numa escala de defeitos, de 1 (sem quaisquer defeitos assinaláveis) a -3 (com defeitos graves).

## **3 Resultados**

- 3.1. Cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa
- 3.2. Análise estatística dos resultados obtidos por cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa
- 3.3. Método de Bradford
- 3.4. Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio
- 3.5. Caracterização físico-química e sensorial das amostras analisadas



### 3.1 Cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa

#### 3.1.1 Amostras de malte

As proteínas existentes nas amostras de malte foram separadas utilizando dois gradientes diferentes, um mais específico para as hordeínas e outro mais específico para as albuminas e outras proteínas solúveis (ver ponto 2.2.3). O gradiente usado na separação das hordeínas originou 9 picos, tanto nas amostras de malte Scarlett, com 60 e 120 horas de germinação (Figura 4), como nas de Prestige, com os mesmos tempos de germinação (Figura 5). Os picos obtidos foram numerados por ordem crescente de hidrofobicidade (procedimento igualmente utilizado em todas as amostras analisadas por RP-HPLC).

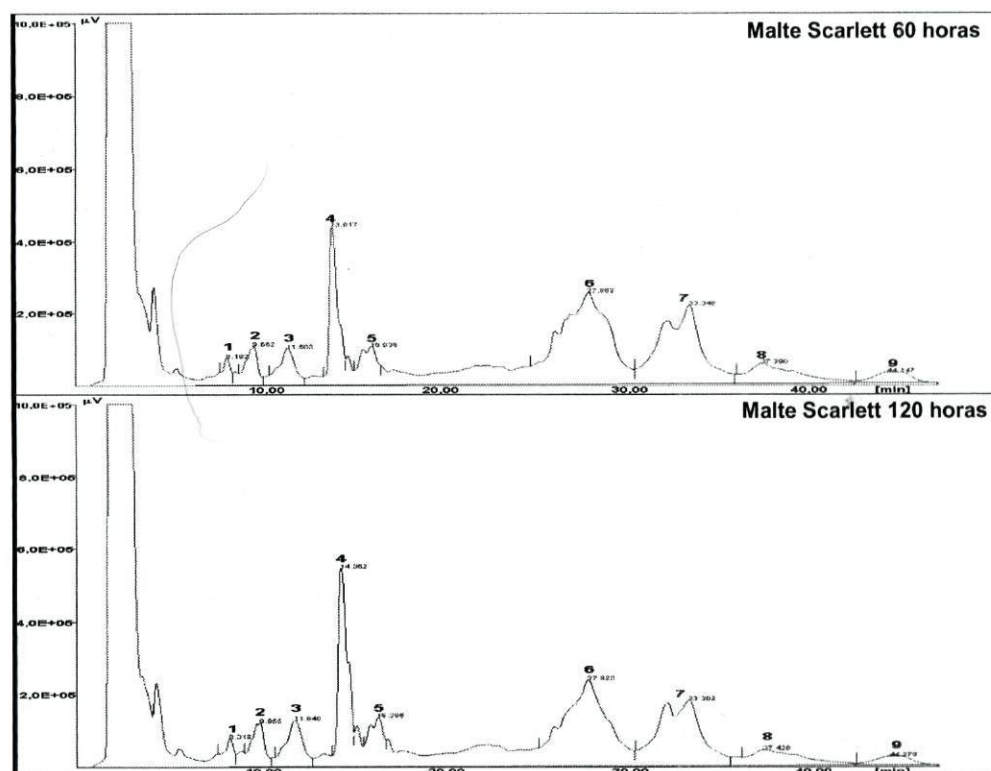
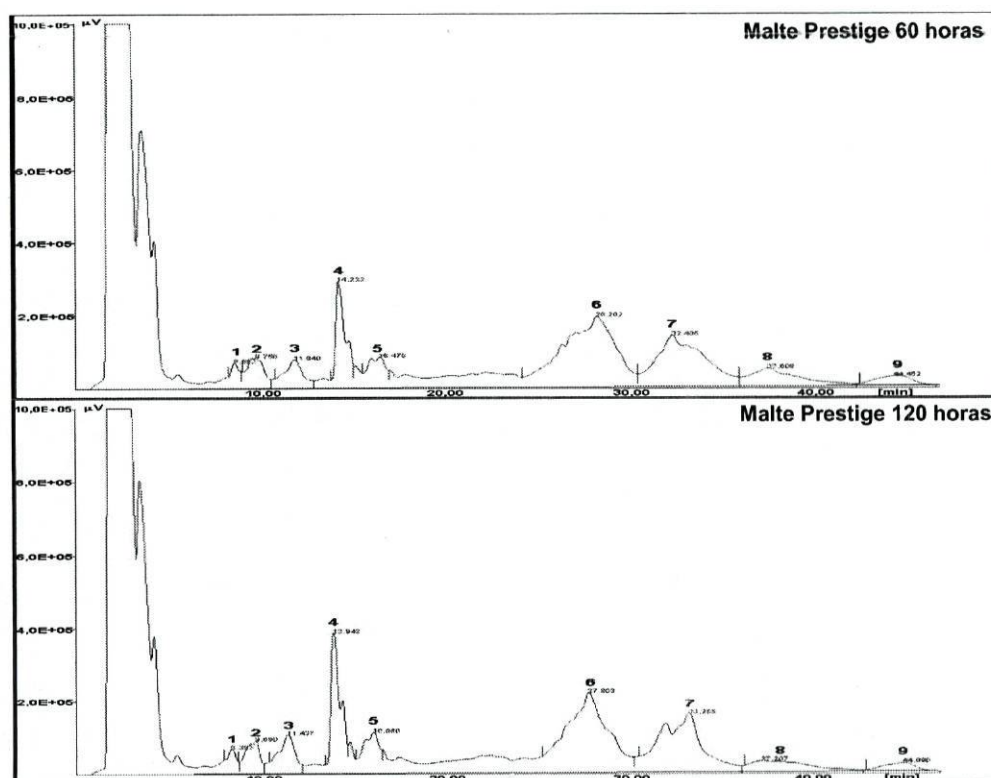


Figura 4 – Cromatogramas típicos das hordeínas de maltes Scarlett com 60 e 120 horas de germinação.



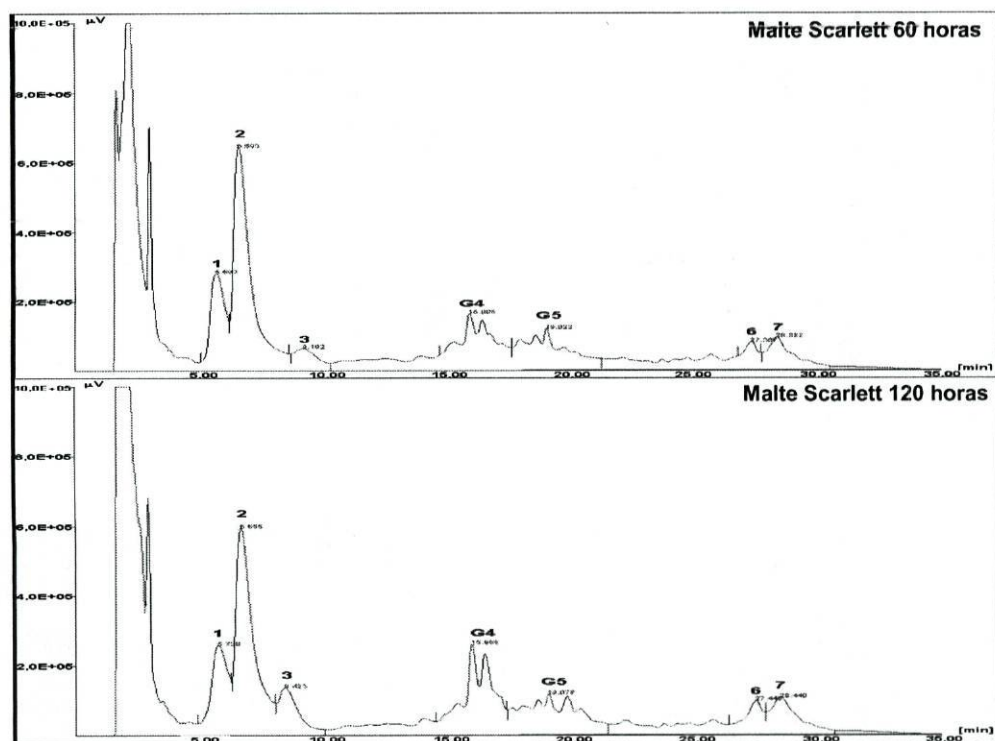
**Figura 5** – Cromatogramas típicos das hordeínas de maltes Prestige com 60 e 120 horas de germinação.

Não foram observadas diferenças qualitativas entre as duas variedades, nem entre os dois tempos de germinação, uma vez que se obtiveram os mesmos picos, com tempos de retenção semelhantes. Do ponto de vista quantitativo, observaram-se diferenças entre os diferentes picos que serão consideradas no ponto 3.2.1.1.

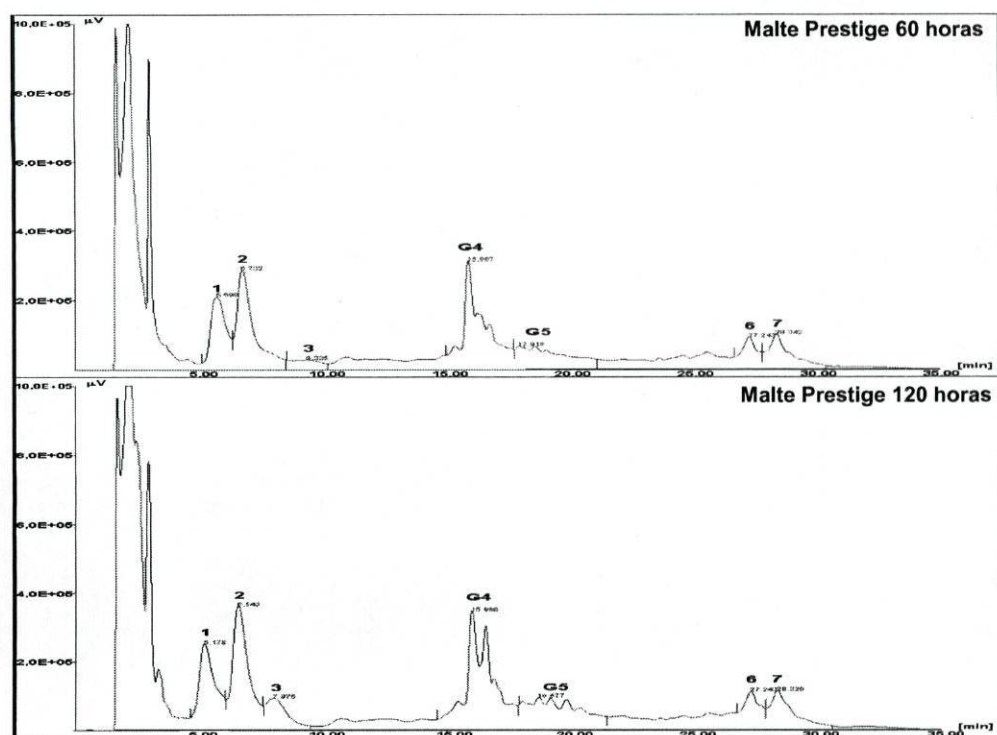
O gradiente utilizado na separação cromatográfica das albuminas e outras proteínas solúveis, por sua vez, originou 7 picos, tanto nas amostras de malte Scarlett, com 60 e 120 horas de germinação (Figura 6), como nas de Prestige, com os mesmos tempos de germinação (Figura 7). Os tempos de retenção dos picos foram também semelhantes em todas as amostras, demonstrando que não existiam diferenças qualitativas entre variedades nem entre tempos de germinação. As diferenças quantitativas, por sua vez, foram posteriormente analisadas (ver ponto 3.2.1.2).

Os picos 4 e 5, na realidade, pareciam ser compostos por várias proteínas, sendo, por isso, designados grupo 4 (**G4**) e grupo 5 (**G5**).





**Figura 6** – Cromatogramas típicos das albuminas e outras proteínas solúveis de maltes Scarlett com 60 e 120 horas de germinação.

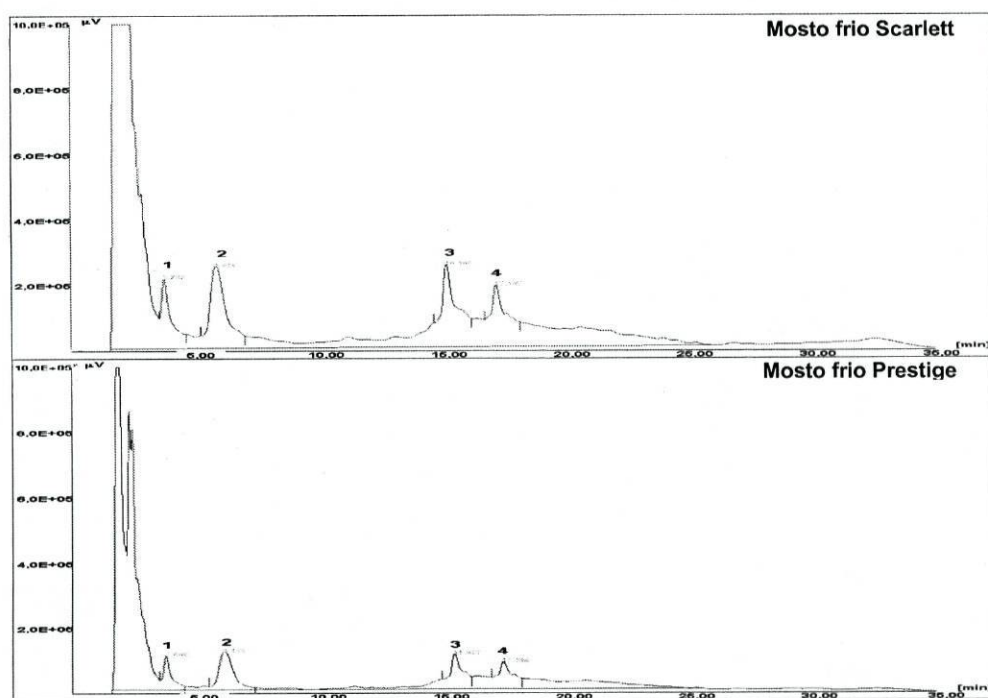


**Figura 7** – Cromatogramas típicos das albuminas e outras proteínas solúveis de maltes Prestige com 60 e 120 horas de germinação.

Em todas as separações cromatográficas das albuminas e outras proteínas solúveis do malte foram recolhidas fracções proteicas, no intervalo 4,5–10,5 min, correspondentes aos picos 1 e 2, onde se verificam as principais diferenças quantitativas. As fracções recolhidas foram posteriormente concentradas e analisadas por SDS-PAGE (Figura 28, página 82).

### 3.1.2 Amostras de mosto e cerveja

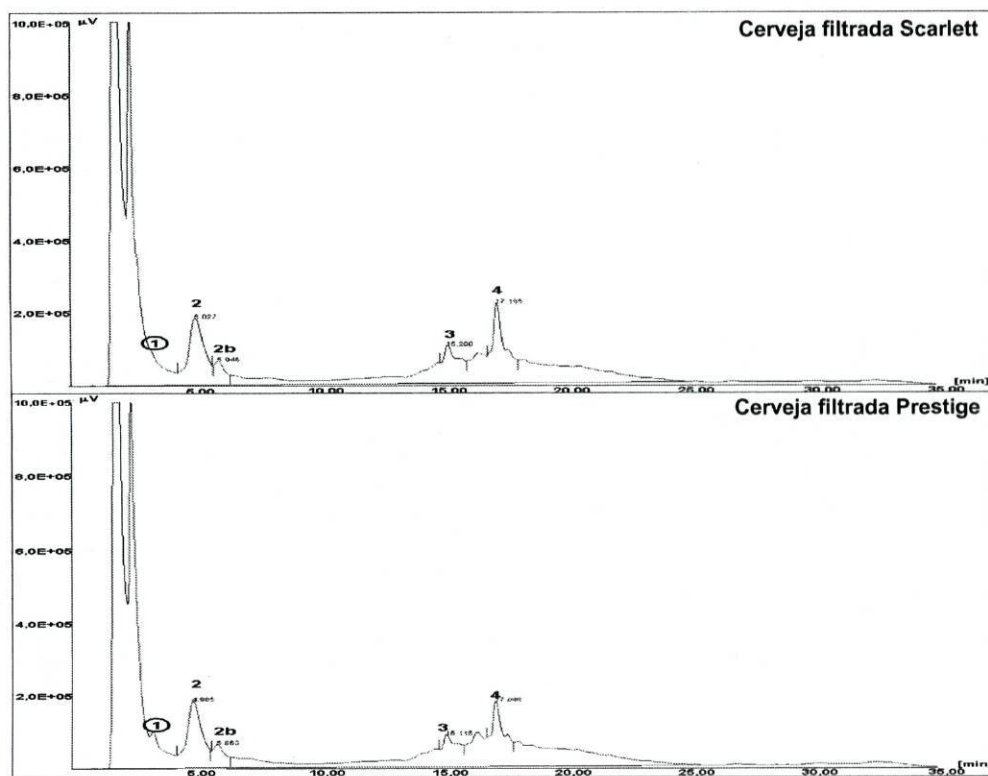
Utilizando o gradiente específico para a eluição das albuminas e outras proteínas solúveis, analisaram-se as amostras de mostos. A Figura 8 representa os cromatogramas típicos dos mostos Scarlett e Prestige. A separação das proteínas originou 4 picos, com tempos de retenção idênticos, nas duas amostras, o que demonstrou que não existiam diferenças qualitativas entre elas. No entanto, verificaram-se diferenças quantitativas, que serão analisadas no ponto 3.2.2.1.



**Figura 8** – Cromatogramas típicos das albuminas e outras proteínas solúveis de mostos frios Scarlett e Prestige.



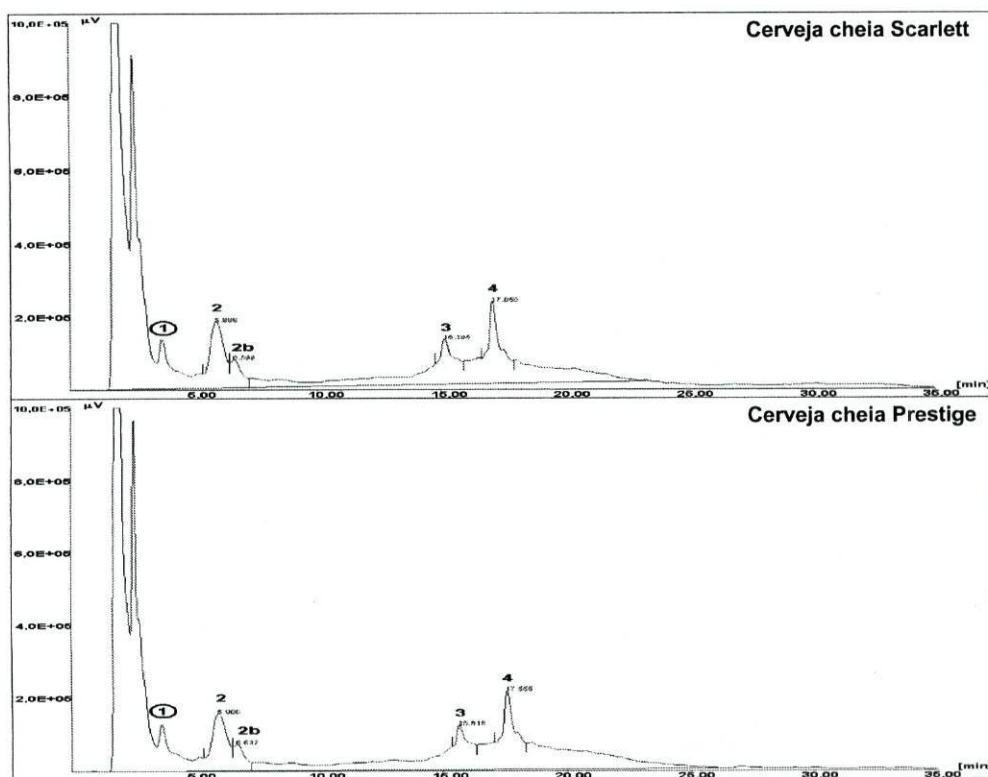
A última etapa do trabalho consistiu na análise das amostras de cerveja, utilizando as condições específicas para a separação das albuminas e outras proteínas solúveis. A Figura 9 representa os cromatogramas típicos das amostras de cerveja filtrada, enquanto que a Figura 10 representa os cromatogramas típicos das cervejas cheias, obtidas a partir de cada um dos mostos.



**Figura 9** – Cromatogramas típicos das albuminas e outras proteínas solúveis de cervejas filtradas Scarlett e Prestige.

A separação das proteínas existentes nas amostras de cerveja filtrada originou três picos bem separados (2, 3 e 4), numerados de acordo com a correspondência com as amostras de mosto, um pico adicional (2b), não observado nas amostras de mosto e um pico com má resolução junto à linha de base, correspondente ao pico 1 das amostras de mosto. A atribuição da numeração dos picos de cerveja baseou-se na comparação entre os perfis cromatográficos e os tempos de retenção das amostras de mosto e de cerveja. As áreas dos picos 1 das amostras de cerveja não foram utilizados no

tratamento estatístico, uma vez que estes picos nem sempre apareciam com boa resolução.



**Figura 10** – Cromatogramas típicos das albuminas e outras proteínas solúveis de cervejas cheias Scarlett e Prestige.

Relativamente às amostras de cerveja cheia, como seria de esperar, obteve-se um perfil cromatográfico idêntico ao das amostras de cerveja filtrada.

Os dados obtidos com a separação das amostras de cerveja (filtrada e cheia) foram posteriormente analisados do ponto de vista quantitativo (ver ponto 3.2.2.2).



## 3.2 Análise estatística dos resultados obtidos por cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa

As áreas obtidas com a injeção diária de padrão externo (BSA a 1 mg/ml) não foram significativamente diferentes e, por isso, não foi efectuada normalização das áreas cromatográficas. Os resultados obtidos exprimem-se em unidades arbitrárias de área, fornecidas pelo software de aquisição de dados.

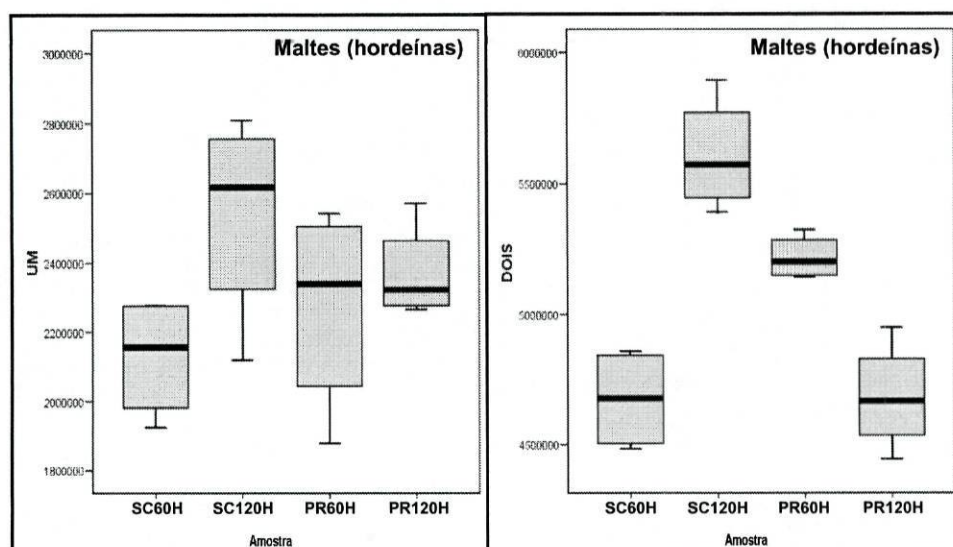
### 3.2.1 Amostras de malte

#### 3.2.1.1 Hordeínas

Como foi referido no ponto 3.1.1, a separação das proteínas existentes nos extractos de malte obtidos pelo método de Schmitt *et al.* (1989) originou 9 picos, tanto nas amostras de Scarlett, com 60 e 120 horas de germinação, como nas de malte Prestige, com os mesmos tempos de germinação. Após a separação cromatográfica das hordeínas, as áreas dos picos obtidas foram analisadas variável a variável, para comparar a evolução das duas variedades de malte nos dois tempos de germinação. Pelo método estatístico ANOVA One-Way verificou-se que o pico 1 era o único que não apresentava diferenças significativas em nenhuma das amostras.

Na Figura 11 estão apresentadas as caixas de bigodes referentes às áreas dos picos 1 e 2. Os resultados destes picos foram apresentados em conjunto, como acontecerá com outros picos, devido à existência de algumas semelhanças. Os coeficientes de variação (CV) das áreas obtidas variaram entre 5,9% e 13,2% para o pico 1 e entre 1,6% e 4,5% para o pico 2. No caso do pico 2 verificou-se que os maltes Scarlett com 120 horas de germinação

apresentaram áreas maiores do que os maltes Scarlett com 60 horas de germinação ( $p = 0,000$ ), o que não acontecia com o malte Prestige, onde as amostras com 60 horas de germinação apresentavam maiores áreas do que as amostras com 120 horas de germinação ( $p = 0,007$ ).

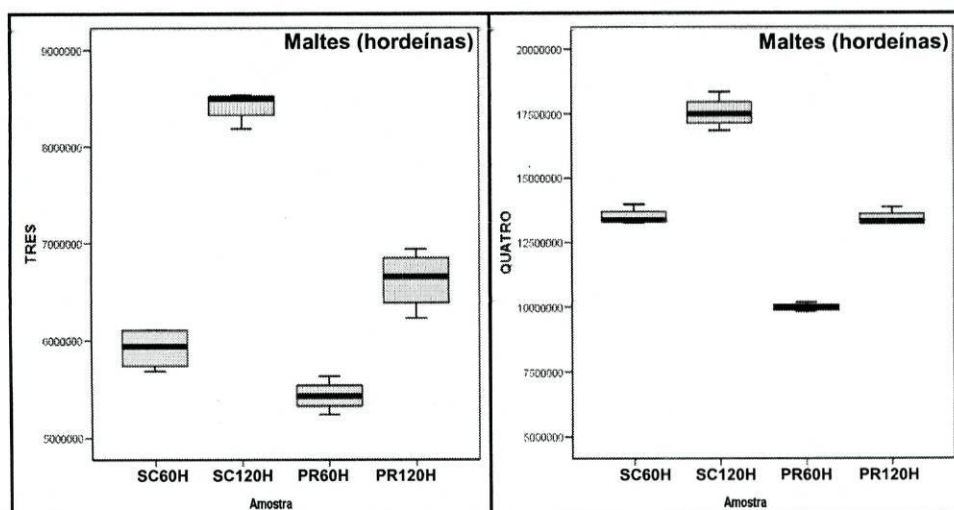


**Figura 11** – Caixas de bigodes das áreas dos picos 1 e 2, resultantes da separação cromatográfica de hordeínas de extractos de malte Scarlett (SC) e Prestige (PR), com 60 (60H) e 120 (120H) horas de germinação, obtidos pelo método de Schmitt *et al.* (1989).

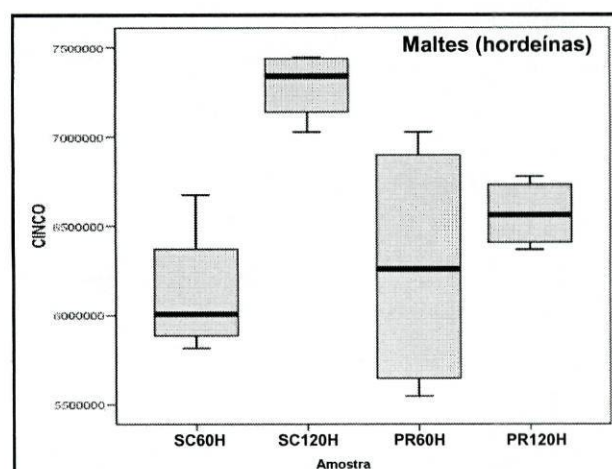
Na Figura 12, por sua vez, é possível observar os resultados dos picos 3 e 4. Os CV das áreas obtidas variaram entre 1,9% e 4,6% para o pico 3 e entre 1,5% e 3,5% para o pico 4. Verificou-se que estes picos correspondem a fracções proteicas que apresentam um comportamento semelhante, aumentando significativamente das 60 para as 120 horas de germinação ( $p = 0,000$ ). Além disso, ambos contêm maiores quantidades de proteína nas amostras da variedade Scarlett ( $p < 0,038$ ).

Os resultados do pico 5 estão apresentados na Figura 13. Os CV das áreas obtidas variaram entre 2,7% e 11,7%. Diferenças estatisticamente significativas foram apenas verificadas entre as amostras de malte Scarlett com 60 e 120 horas de germinação ( $p = 0,012$ ), apresentando as últimas maiores quantidades de proteína.





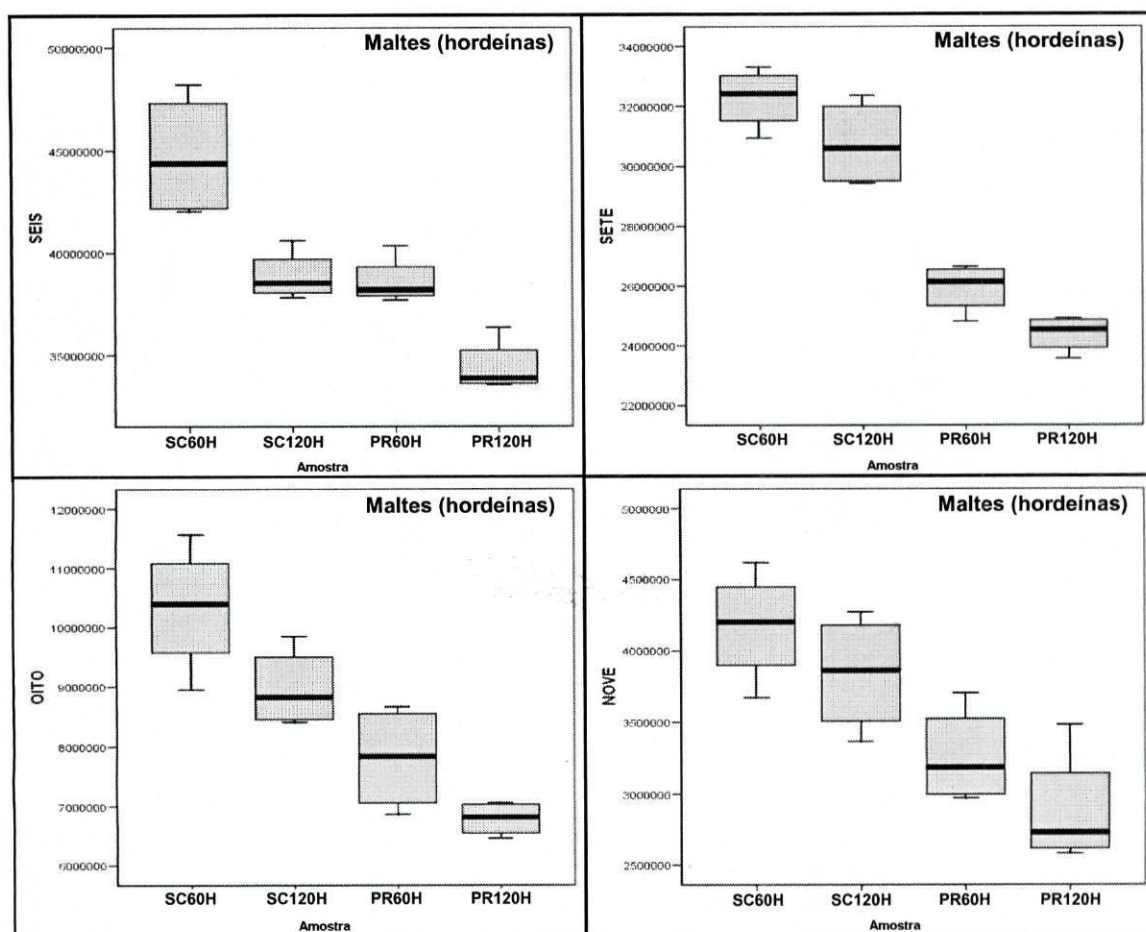
**Figura 12** – Caixas de bigodes das áreas dos picos 3 e 4, resultantes da separação cromatográfica de hordeínas de extractos de malte Scarlett (SC) e Prestige (PR), com 60 (60H) e 120 (120H) horas de germinação, obtidos pelo método de Schmitt *et al.* (1989).



**Figura 13** – Caixas de bigodes das áreas dos picos 5, resultantes da separação cromatográfica de hordeínas de extractos de malte Scarlett (SC) e Prestige (PR), com 60 (60H) e 120 (120H) horas de germinação, obtidos pelo método de Schmitt *et al.* (1989).

Relativamente aos picos 6, 7, 8 e 9, mais hidrofóbicos, os resultados estão apresentados na Figura 14. Os CV das áreas obtidas variaram entre 3% e 6,8% para o pico 6, entre 2,5% e 4,8% para o pico 7, entre 4,3% e 11,3% para o pico 8 e entre 9,4% e 14,3% para o pico 9. De uma forma geral, para o mesmo tempo de germinação, a variedade Scarlett apresentava maiores quantidades de proteína do que a Prestige ( $p < 0,028$ ) e, para ambas as variedades, as amostras com 60 horas de germinação apresentavam maiores

quantidades de proteína do que as amostras com 120 horas de germinação. Ao contrário do que foi verificado no pico 6, em que os resultados eram estatisticamente significativos entre tempos de germinação ( $p < 0,034$ ), no caso dos picos 7, 8 e 9, as diferenças observadas entre tempos de germinação, tanto na variedade Scarlett como na Prestige, não eram estatisticamente significativas.



**Figura 14** – Caixas de bigodes das áreas dos picos 6, 7, 8 e 9, resultantes da separação cromatográfica de hordeínas de extractos de malte Scarlett (SC) e Prestige (PR), com 60 (60H) e 120 (120H) horas de germinação, obtidos pelo método de Schmitt *et al.* (1989).

Para discriminar as amostras de malte, de acordo com a sua composição em hordeínas, foi realizada uma Análise de Componentes Principais. Este tratamento estatístico teve como objectivo simplificar os resultados, tornando-os mais facilmente interpretáveis, sem, contudo, perder o



essencial da informação obtida. Os resultados do estudo da aplicabilidade da Análise de Componentes Principais aos dados obtidos foram os seguintes:

- Todas as variáveis tinham uma distribuição normal, eram simétricas ( $|\text{assimetria}/\text{std.error}_{\text{assimetria}}| < 1,96$ ) e mesocúrticas ( $|\text{curtose}/\text{std.error}_{\text{curtose}}| < 1,96$ );
- A medida da qualidade das correlações entre variáveis, KMO, foi igual a 0,631, confirmado pelo teste de esfericidade de Bartlett ( $p < 0,01$ );
- A matriz anti-imagem, que é uma medida da adequação amostral de cada variável para a utilização da ACP, confirmou a aplicabilidade da análise factorial;
- As comunalidades, que indicam a quantidade de variância partilhada pelo menos com uma das variáveis do conjunto, também foram elevadas ( $> 0,772$ ).

Com a ACP, utilizando rotação Varimax, com normalização de Kaiser, foram obtidas duas novas variáveis: componente 1, que explica cerca de 51,5% da variância dos dados, e componente 2, que explica cerca de 37,7% da variância dos dados. No conjunto, as duas componentes explicam cerca de 89,2% dos dados obtidos (Tabela 9).

**Tabela 9** – Extração das componentes dos resultados da separação cromatográfica de hordeínas das amostras de malte.

Variância total explicada									
Componente (factor)	Eigenvalues (valores próprios) iniciais			Extração			Após rotação		
	Total	% da variância	% cumulativa	Total	% da variância	% cumulativa	Total	% da variância	% cumulativa
1	3,710	53,000	53,000	3,710	53,000	53,000	3,603	51,465	51,465
2	2,535	36,210	89,210	2,535	36,210	89,210	2,642	37,744	89,210
3	,491	7,021	96,230						
4	,135	1,925	98,155						
5	,070	,997	99,151						
6	,040	,574	99,726						
7	,019	,274	100,000						

Método de extração: Análise de Componentes Principais

As variáveis com maior peso nas componentes extraídas são as que apresentam valor superior a 0,5 (Tabela 10). À componente 1 estão associadas as áreas dos picos **6, 7, 8 e 9** e à componente 2 as áreas dos picos **3, 4 e 5**.

**Tabela 10** – Pesos das variáveis que contribuem para cada uma das componentes extraídas.**Matriz das componentes após rotação ortogonal<sup>a</sup>**

Variáveis	Componente (factor)	
	1	2
OITO	,978	-,001
NOVE	,942	,077
SETE	,920	,289
SEIS	,896	-,165
TRES	,060	,966
QUATRO	,268	,924
CINCO	-,182	,860

Método de extracção: Análise de Componentes Principais.

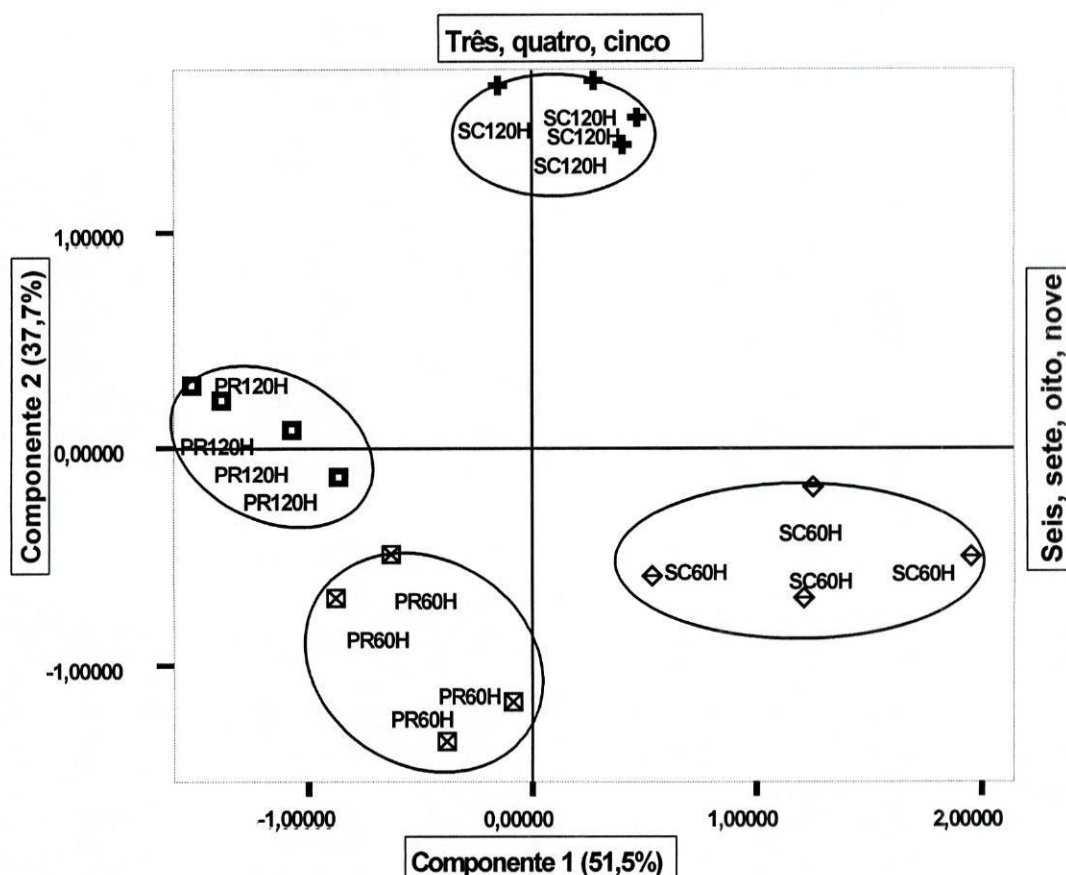
Método de rotação: Varimax com Normalização de Kaiser.

a. A rotação convergiu em 3 iterações.

Na Figura 15 está apresentada a representação gráfica que relaciona as componentes 1 e 2. Foi possível agrupar as amostras de malte analisadas em quatro conjuntos. A posição relativa desses conjuntos no gráfico está relacionada com o seu maior ou menor conteúdo em hordeínas, de acordo com os resultados obtidos com a separação cromatográfica. Pode-se observar uma separação clara entre as variedades Scarlett e Prestige, assim como entre as amostras com 60 e com 120 horas de germinação.

As amostras de malte Scarlett foram aquelas que apresentaram maiores quantidades de proteína, em todos os picos obtidos. Enquanto que as amostras de Scarlett com 60 horas de germinação apresentaram maiores quantidades de hordeínas existentes nos picos **6, 7, 8 e 9**, mais hidrofóbicos, as amostras de Scarlett com 120 horas de germinação apresentaram maiores quantidades de hordeínas existentes nos picos **3, 4 e 5**, mais hidrofílicos. Das 60 para as 120 horas de germinação houve uma diminuição da quantidade das hordeínas existentes nos picos **6, 7, 8 e 9** e um aumento das hordeínas existentes nos picos **3, 4 e 5**. As amostras de malte Prestige, que continham menores quantidades de proteína, apresentaram um comportamento semelhante. Das 60 para as 120 horas de germinação ocorreu também uma diminuição dos picos mais hidrofóbicos **6, 7, 8 e 9** e um aumento dos picos mais hidrofílicos **3, 4 e 5**.



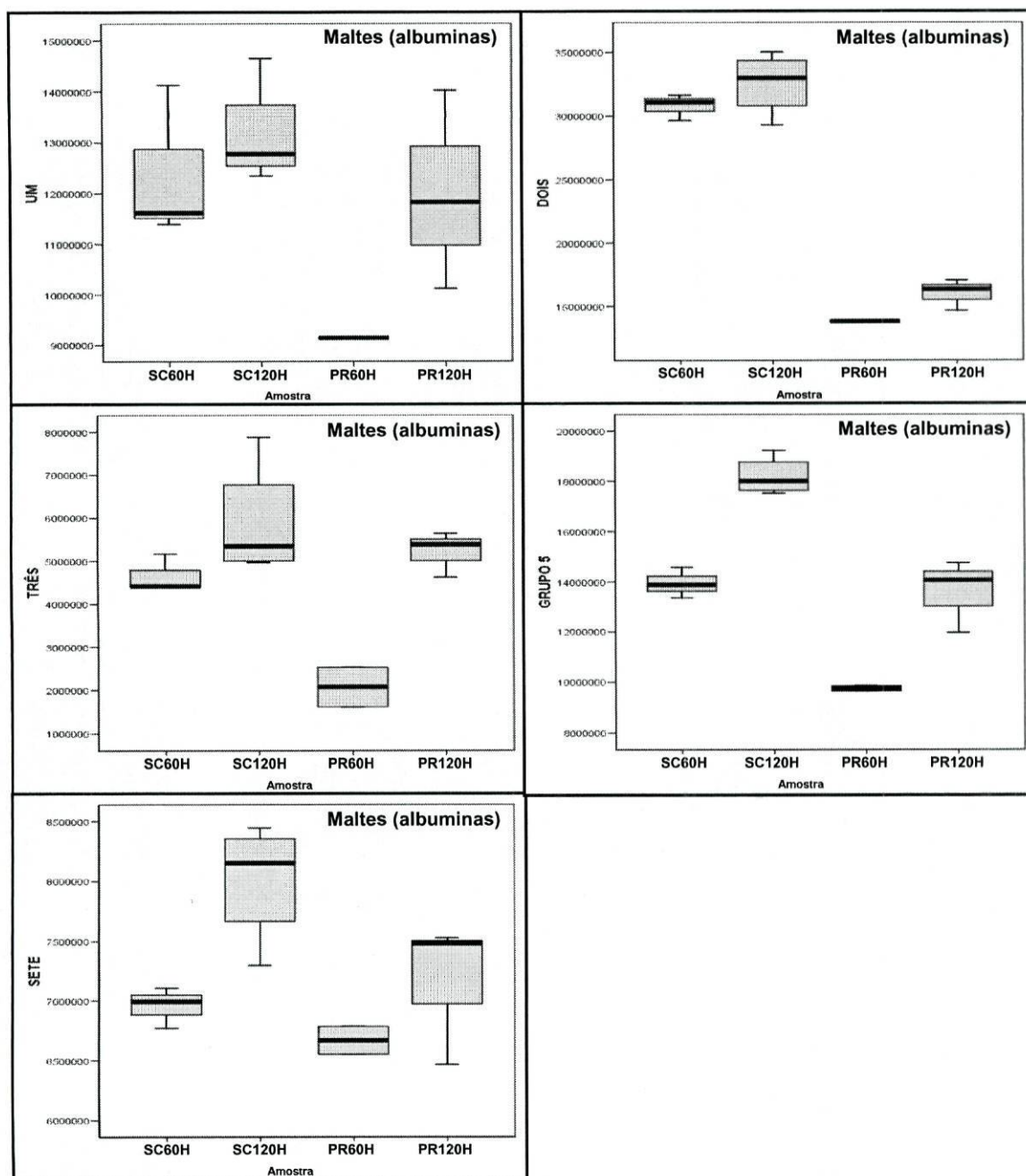


**Figura 15** – Representação gráfica da ACP das áreas dos picos resultantes da separação cromatográfica das amostras de extracto de malte, obtido pelo método de Schmitt *et al.* (1989). SC60H ◇ – Malte Scarlett com 60 horas de germinação; SC120H + – Malte Scarlett com 120 horas de germinação; PR60H ⊠ – Malte Prestige com 60 horas de germinação; PR120H ■ – Malte Prestige com 120 horas de germinação.

### 3.2.1.2 Albuminas e outras proteínas solúveis

A separação das proteínas existentes nos extractos de malte obtidos pelo método de Howard *et al.* (1996) originou sete picos, tanto nas amostras de malte Scarlett, com 60 e 120 horas de germinação, como nas de Prestige, com os mesmos tempos de germinação (ver ponto 3.1.1). Após a separação cromatográfica destas proteínas, realizou-se o mesmo procedimento utilizado no caso das hordeínas, analisando-se cada uma das variáveis individualmente, com o objectivo de acompanhar a evolução das duas variedades de malte nos dois tempos de germinação. Na Figura 16 estão apresentadas as caixas de

bigodes referentes às áreas dos picos 1, 2, 3, G5 e 7 da referida separação cromatográfica.



**Figura 16** – Caixas de bigodes das áreas dos picos 1, 2, 3, G5 e 7, resultantes da separação cromatográfica de albuminas e outras proteínas solúveis de extractos de malte Scarlett (SC) e Prestige (PR), com 60 (60H) e 120 (120H) horas de germinação, obtidos pelo método de Howard *et al.* (1996).



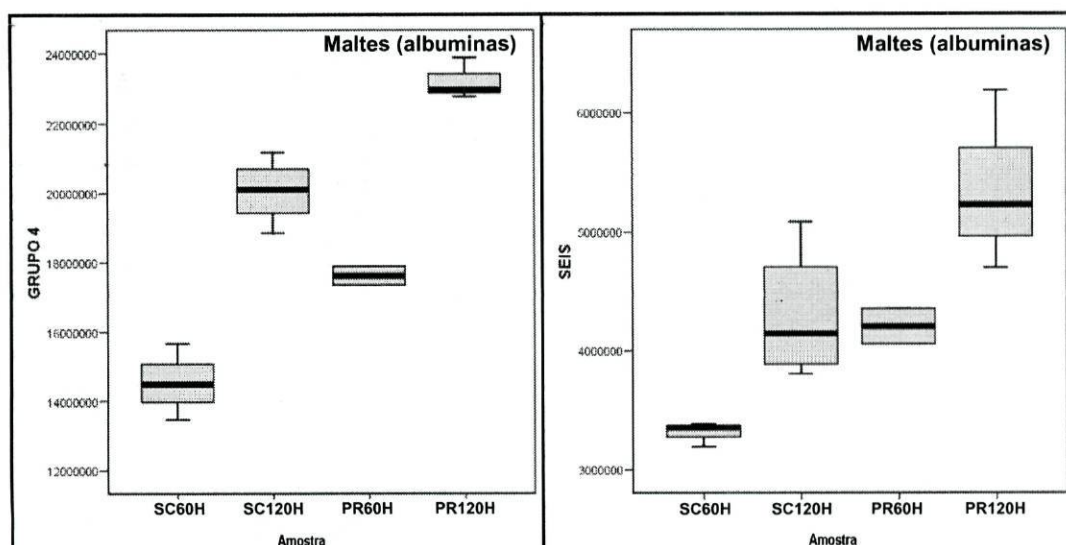
Os CV das áreas obtidas para os picos apresentados na Figura 16 variaram entre 0,3% e 16,3% para o pico 1, entre 0,8% e 7,6% para o pico 2, entre 9,4% e 31,2% para o pico 3, entre 1,6% e 10,6% para o grupo 5 (G5) e entre 2,4% e 8,4% para o pico 7.

Pelo método estatístico ANOVA One-Way com teste *post-hoc* de Tukey HSD verificou-se que o pico 1 e o pico 7 não apresentavam diferenças estatisticamente significativas entre variedades nem entre tempos de germinação. De uma forma geral, para os mesmos tempos de germinação, a variedade Scarlett apresentava maiores quantidades de proteína do que a Prestige. Para ambas as variedades, as amostras com 120 horas de germinação apresentavam maiores quantidades de proteína do que as amostras com 60 horas de germinação.

Atendendo aos resultados do teste *post-hoc* de Tukey HSD, pode-se observar que: relativamente ao pico 2, as diferenças observadas entre as amostras foram apenas significativas entre variedades ( $p = 0,000$ ) e não entre tempos de germinação; no caso do pico 3, as diferenças estatisticamente significativas foram apenas observadas entre as amostras de Prestige com 60 e com 120 horas de germinação ( $p = 0,025$ ); finalmente, no caso do grupo 5 (G5), todas as diferenças observadas na figura são estatisticamente significativas ( $p < 0,008$ ).

Na Figura 17, por sua vez, é possível observar as caixas de bigodes referentes aos picos G4 e 6 da separação cromatográfica. Os CV das áreas apresentadas variaram entre 2,1% e 7,5% para o grupo 4 (G4) e entre 3,1% e 14,0% para o pico 6.

Utilizando o método ANOVA One-Way com teste *post-hoc* de Tukey HSD verificou-se que as áreas do pico 6 também não apresentavam diferenças estatisticamente significativas entre variedades nem entre tempos de germinação. Relativamente ao grupo 4 (G4), todas as diferenças observadas na figura são estatisticamente significativas ( $p < 0,010$ ). No caso deste grupo de picos, para os mesmos tempos de germinação, a variedade Prestige apresentava maiores quantidades de proteína do que a variedade Scarlett e, para ambas as variedades, de acordo com o que foi verificado nos picos 1, 2, 3, G5 e 7, as amostras com 120 horas de germinação apresentavam maiores quantidades de proteína do que as amostras com 60 horas de germinação.



**Figura 17** – Caixas de bigodes das áreas dos picos G4 e 6, resultantes da separação cromatográfica de albuminas e outras proteínas solúveis de extractos de malte Scarlett (SC) e Prestige (PR), com 60 (60H) e 120 (120H) horas de germinação, obtidos pelo método de Howard *et al.* (1996).

Depois de analisar, individualmente, as variáveis obtidas com a separação cromatográfica das albuminas e outras proteínas solúveis do malte, procedeu-se a uma Análise de Componentes Principais, tendo em mente as vantagens deste tratamento estatístico, anteriormente enunciadas. Uma vez mais, estudou-se a aplicabilidade da ACP aos dados obtidos. Os resultados foram os seguintes:

- De uma forma geral, as variáveis tinham uma distribuição normal, simétrica ( $|assimetria/std.error_{assimetria}| < 1,96$ ) e mesocúrtica ( $|curtose/std.error_{curtose}| < 1,96$ );
- A medida da qualidade das correlações entre variáveis, KMO, foi igual a 0,521, confirmado pelo teste de esfericidade de Bartlett ( $p < 0,01$ );
- A matriz anti-imagem, em geral, demonstrou a aplicabilidade da análise factorial;
- As comunalidades obtidas foram elevadas ( $> 0,669$ ).

Com a ACP foram obtidas duas novas variáveis: componente 1, que explica cerca de 52,3% da variância dos dados, e componente 2, que explica cerca de 32,1% da variância dos dados. No conjunto, as duas componentes explicam cerca de 84,4% dos dados obtidos (Tabela 11).



**Tabela 11** – Extracção das componentes dos resultados da separação cromatográfica de albuminas e outras proteínas solúveis das amostras de malte.

Variância total explicada						
Componente (factor)	Eigenvalues (valores próprios) iniciais			Extracção		
	Total	% da variância	% cumulativa	Total	% da variância	% cumulativa
1	3,662	52,309	52,309	3,662	52,309	52,309
2	2,248	32,110	84,419	2,248	32,110	84,419
3	,435	6,212	90,631			
4	,410	5,858	96,489			
5	,191	2,728	99,217			
6	,051	,730	99,946			
7	,004	,054	100,000			

Método de extracção: Análise de Componentes Principais.

À componente 1 estão associadas as áreas dos picos **1, 2, 3, G5 e 7** e à componente 2 as áreas dos picos **2, G4 e 6** (Tabela 12).

**Tabela 12** – Pesos das variáveis que contribuem para cada uma das componentes extraídas.

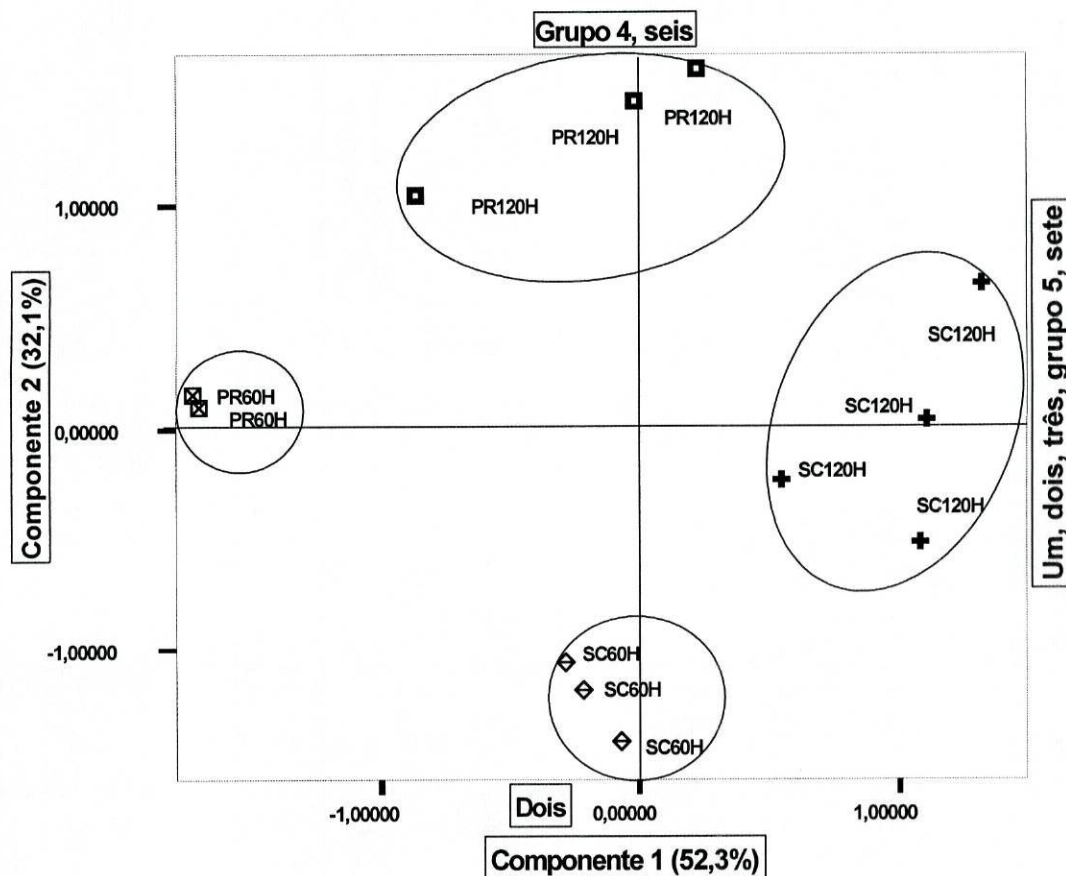
Matriz das componentes <sup>a</sup>		
Variáveis	Componente (factor)	
	1	2
UM	,825	-,121
DOIS	,737	-,648
TRÊS	,801	,168
GRUPO 4	,240	,916
GRUPO 5	,970	-,066
SEIS	,136	,954
SETE	,883	,179

Método de extracção: Análise de Componentes Principais.

a. 2 componentes extraídas.

Na Figura 18 está apresentada a representação gráfica que relaciona as componentes 1 e 2. É possível verificar-se a existência de quatro grupos bem definidos e claramente separados, correspondentes a cada uma das amostras de malte analisadas. Como já referido anteriormente, a posição relativa das amostras no gráfico está relacionada com o seu maior ou menor conteúdo de determinadas proteínas, separadas cromatograficamente. Às 60 horas de germinação, a variedade Scarlett apresentava maiores quantidades de proteínas existentes nos picos **1, 2, 3, G5 e 7** do que a variedade Prestige, que, por sua vez, tinha maiores quantidades de proteínas presentes nos picos **G4 e 6**. Às 120 horas de germinação, tanto na variedade Scarlett como na Prestige, verificou-se um aumento da quantidade das proteínas existentes em todos os

picos referidos. Neste tempo de germinação, a maior quantidade de proteínas dos picos 1, 2, 3, G5 e 7 manteve-se na variedade Scarlett e a maior quantidade de proteínas dos picos G4 e 6 na variedade Prestige.



**Figura 18** – Representação gráfica da ACP das áreas dos picos resultantes da separação cromatográfica das amostras de extracto de malte, obtido pelo método de Howard *et al.* (1996). SC60H ◇ – Malte Scarlett com 60 horas de germinação; SC120H + – Malte Scarlett com 120 horas de germinação; PR60H ☒ – Malte Prestige com 60 horas de germinação; PR120H ■ – Malte Prestige com 120 horas de germinação.

### 3.2.2 Amostras de mosto e cerveja

#### 3.2.2.1 Amostras de mosto

Como foi referido no ponto 3.1.2, a separação cromatográfica das proteínas existentes nas amostras de mosto originou 4 picos. Após a referida



separação, as áreas dos diferentes picos foram analisadas individualmente. Na Figura 19 estão apresentados, na forma de caixas de bigodes, os resultados obtidos para o mosto Scarlett e para o mosto Prestige. Como referido anteriormente, uma das condições da aplicabilidade do teste *t* de Student de comparação de médias é a normalidade da distribuição dos dados, nas duas amostras comparadas. Através do teste de Shapiro-Wilk, comprovou-se essa condição. Utilizando o teste *t* de Student, verificou-se que, em todos os picos, as diferenças verificadas entre os dois mostos eram estatisticamente significativas ( $p = 0,000$ ).



**Figura 19** – Caixas de bigodes das áreas dos picos resultantes da separação cromatográfica das proteínas existentes em amostra de mosto.

Os CV dos dados obtidos foram de 7,4% para o mosto Scarlett e 11,2% para o mosto Prestige, no caso do pico 1. Relativamente ao pico 2 foram de

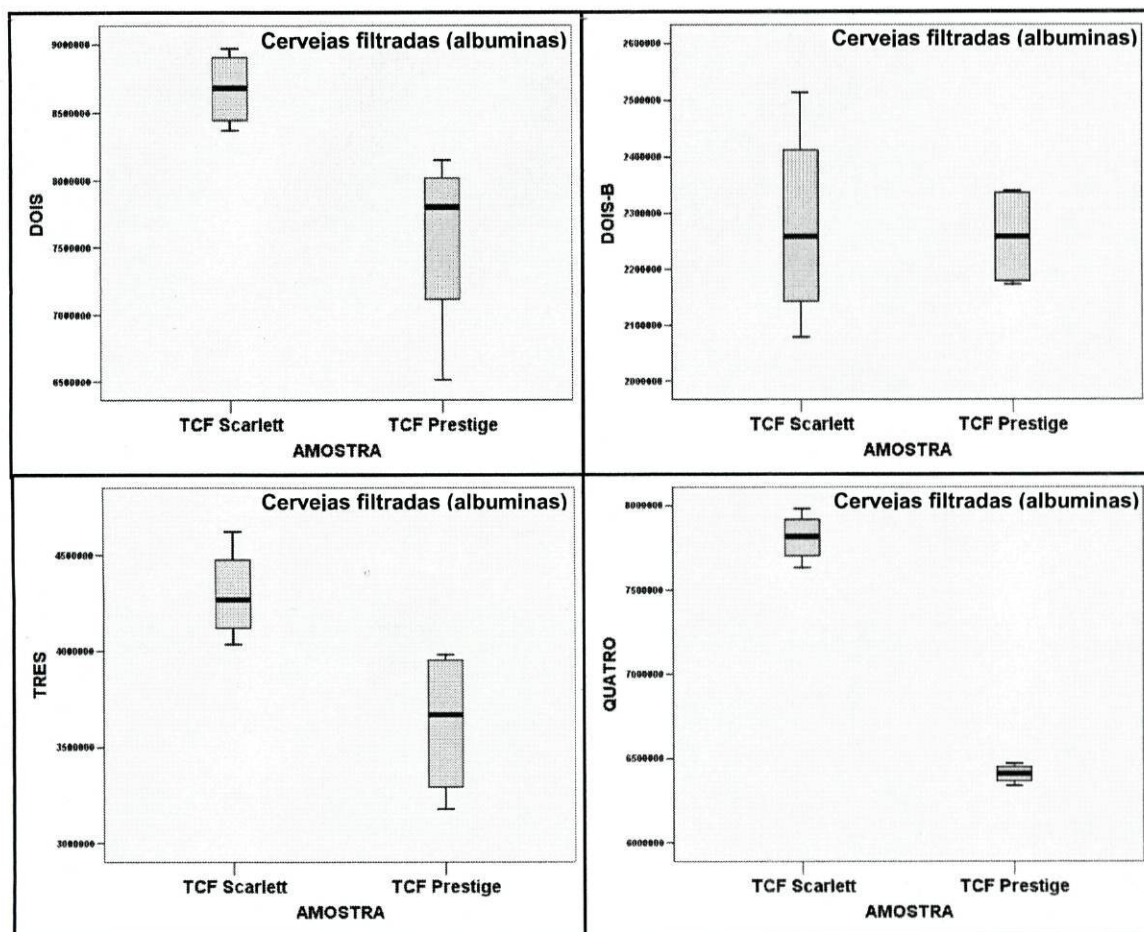
2,9% para o mosto Scarlett e 10,6% para o Prestige. No que diz respeito ao pico **3** os CV foram de 7,4% para o mosto Scarlett e 12,8% para o mosto Prestige. Finalmente, no caso do pico **4** foram de 4,8% para o mosto Scarlett e 5,8% para o Prestige. Como se pode observar pela figura, os mostos obtidos a partir dos maltes Scarlett apresentam uma quantidade superior de albuminas e outras proteínas solúveis em todos os picos obtidos.

### 3.2.2.2 Amostras de cerveja filtrada

A separação cromatográfica das proteínas existentes nas amostras de cerveja filtrada, como referido no ponto 3.1.2, originou cinco picos, que foram numerados de acordo com a correspondência com as amostras de mosto. Obtiveram-se três picos bem separados (**2**, **3** e **4**), um pico adicional (**2b**), não observado nas amostras de mosto, e um pico com má resolução junto à linha de base, correspondente ao pico **1** das amostras de mosto, cujos valores não foram utilizados no tratamento estatístico. Na Figura 20 estão apresentados os resultados obtidos para as cervejas filtradas, produzidas a partir das duas variedades estudadas. Para averiguar o significado estatístico das diferenças observadas entre as amostras, realizou-se um teste *t* de Student. Este método de comparação de médias foi precedido pelo teste de Shapiro-Wilk, realizado com o objectivo de demonstrar a normalidade da distribuição dos dados obtidos. Os resultados obtidos comprovaram a existência dessa normalidade de distribuição de dados. Como se pode verificar na Figura 20, as cervejas filtradas provenientes da variedade Scarlett, de uma forma geral, continham maiores quantidades de proteína do que as provenientes da variedade Prestige. Através do teste *t* de Student verificou-se que as diferenças observadas eram estatisticamente significativas nos picos **2**, **3** e **4** ( $p = 0,029$ ,  $0,027$  e  $0,000$ , respectivamente). Relativamente ao pico **2b** não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas.

Os CV dos dados obtidos para os picos da cerveja filtrada Scarlett foram de 3,2% (pico **2**), 8,1% (pico **2b**), 5,7% (pico **3**) e 1,9% (pico **4**). Relativamente à cerveja filtrada Prestige foram de 9,6% (pico **2**), 4,0% (pico **2b**), 10,8% (pico **3**) e 0,9% (pico **4**).





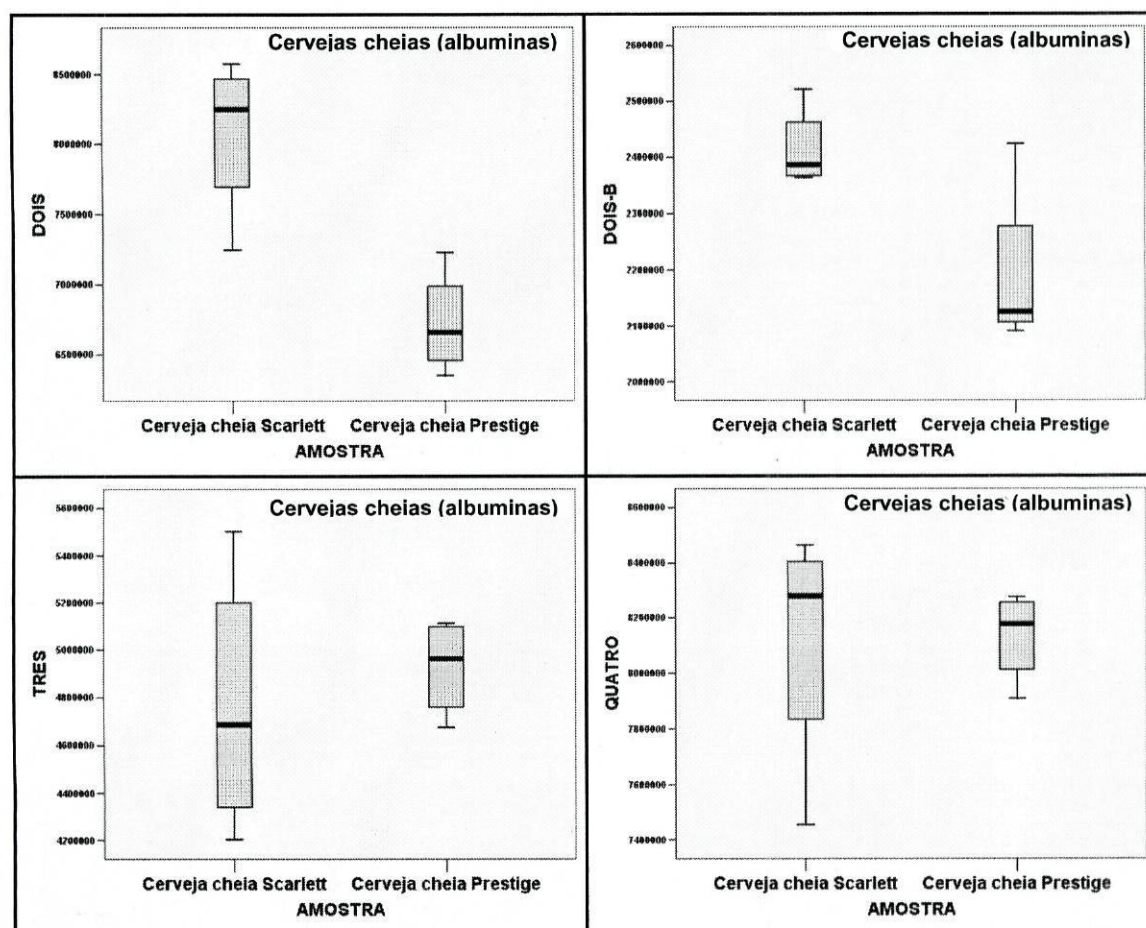
**Figura 20** – Caixas de bigodes das áreas dos picos resultantes da separação cromatográfica das proteínas existentes em amostras de cerveja filtrada (TCF).

### 3.2.2.3 Amostras de cerveja cheia

O perfil cromatográfico obtido com a separação das proteínas, existentes nas amostras de cerveja cheia, foi idêntico ao das amostras de cerveja filtrada (ver ponto 3.1.2), obtendo-se o mesmo número de picos, com os mesmos tempos de retenção. A numeração destes picos, tal como efectuado nas amostras de cerveja cheia, foi realizada por comparação com as amostras de mosto. Na Figura 21 é possível observar os resultados obtidos com a referida separação. Uma vez mais, foi realizado um teste *t* de Student, para verificar diferenças entre as amostras das duas variedades. A normalidade da distribuição dos dados foi previamente demonstrada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os resultados do teste *t* demonstraram que as diferenças

entre as amostras das duas variedades eram apenas significativas nos casos dos picos **2** ( $p = 0,008$ ) e **2b** ( $p = 0,041$ ). Nestes dois picos, a amostra proveniente da variedade Scarlett apresentava maiores quantidades de proteína. Relativamente aos picos **3** e **4**, os resultados obtidos foram muito semelhantes para as amostras das duas variedades, não se encontrando diferenças significativas.

Os dados obtidos com a separação das proteínas existentes nas amostras de cerveja cheia, provenientes da variedade Scarlett, apresentaram CV de 7,2% (pico **2**), 3,0% (pico **2b**), 11,8% (pico **3**) e 5,6% (pico **4**). No caso das amostras provenientes das variedade Prestige os CV foram de 5,6% (pico **2**), 7,1% (pico **2b**), 4,2% (pico **3**) e 2,0% (pico **4**).



**Figura 21** – Caixas de bigodes das áreas dos picos resultantes da separação cromatográfica das proteínas existentes em amostras de cerveja cheia.



### 3.2.2.4 Comparação das amostras de mosto e de cerveja

Depois de analisar individualmente os resultados das amostras de mosto e de cerveja (filtrada e cheia), realizou-se uma Análise de Componentes Principais, utilizando os dados obtidos com a separação cromatográfica das proteínas existentes nessas amostras. O objectivo deste procedimento foi verificar se algumas das amostras se agrupavam, de acordo com semelhanças existentes entre elas, ou, por outro lado, se separavam, devido a características diferentes. Como anteriormente referido, o pico 1, bem separado nas amostras de mosto, não apresentou boa resolução nas amostras de cerveja e, por isso, não foi utilizado nesta ACP.

Os resultados da aplicabilidade da Análise de Componentes Principais aos dados obtidos foram os seguintes:

- A distribuição dos dados, de uma forma geral, era normal, simétrica ( $|assimetria/std.error_{assimetria}| < 1,96$ ) e mesocúrtica ( $|curtose/std.error_{curtose}| < 1,96$ );
- O valor de KMO foi igual a 0,414, confirmado pelo teste de esfericidade de Bartlett ( $p < 0,01$ );
- A matriz anti-imagem, de uma forma geral, demonstrou a aplicabilidade da análise factorial;
- As comunalidades obtidas foram elevadas ( $>0,908$ ).

Com esta Análise de Componentes Principais foram obtidas duas novas variáveis: componente 1, que explica cerca de 60,5% da variância dos dados, e componente 2, que explica cerca de 35,4% da variância dos dados. As duas componentes explicam cerca de 96,0% dos dados (Tabela 13).

**Tabela 13** – Extracção das componentes dos resultados da separação cromatográfica das proteínas existentes nas amostras de mosto, cerveja filtrada e cerveja cheia.

Componente (factor)	Variância total explicada			Extracção		
	Eigenvalues (valores próprios) iniciais					
	Total	% da variância	% cumulativa	Total	% da variância	% cumulativa
1	2,422	60,549	60,549	2,422	60,549	60,549
2	1,417	35,434	95,983	1,417	35,434	95,983
3	,147	3,674	99,657			
4	,014	,343	100,000			

Método de extracção: Análise de Componentes Principais

À componente 1 estão associadas as áreas dos picos 2, 3 e 4 e à componente 2 as áreas dos picos 2b e 4 (Tabela 14).

Tabela 14 – Pesos das variáveis que contribuem para cada uma das componentes extraídas.

Matriz das componentes

Variáveis	Componente (factor)	
	1	2
DOIS	,953	,013
TRÊS	,920	-,350
QUATRO	,803	,568
DOIS-B	-,148	,986

Método de extracção: Análise de Componentes Principais  
a. 2 componentes extraídas.

Na Figura 22 está apresentada a representação gráfica que relaciona as duas componentes extraídas.

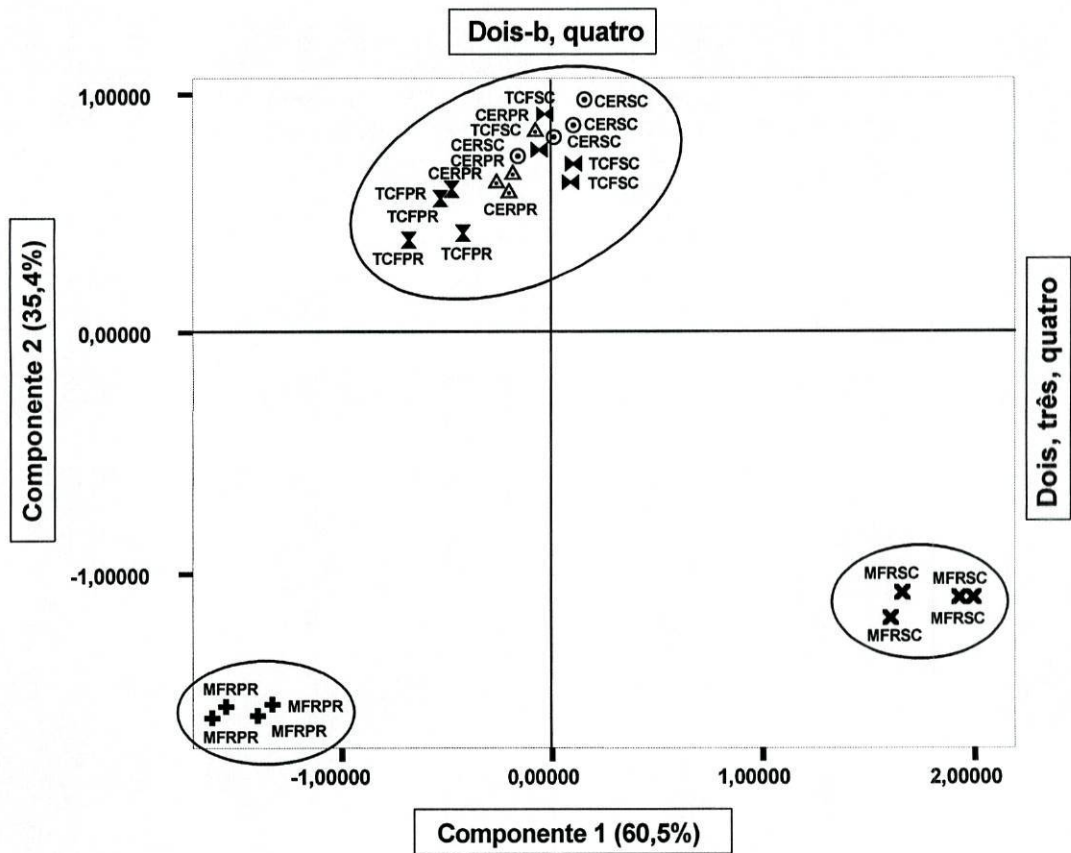


Figura 22 – Representação gráfica da ACP das áreas dos picos resultantes da separação cromatográfica das proteínas existentes nas amostras de mosto, cerveja filtrada e cerveja cheia. MFRSC ✕ – Mosto Scarlett; MFRPR + – Mosto Prestige; TCFSC ◀ – Cerveja filtrada Scarlett; TCFPR ⚓ – Cerveja filtrada Prestige; CERSC ⊙ – Cerveja cheia Scarlett; CERPR △ – Cerveja cheia Prestige.

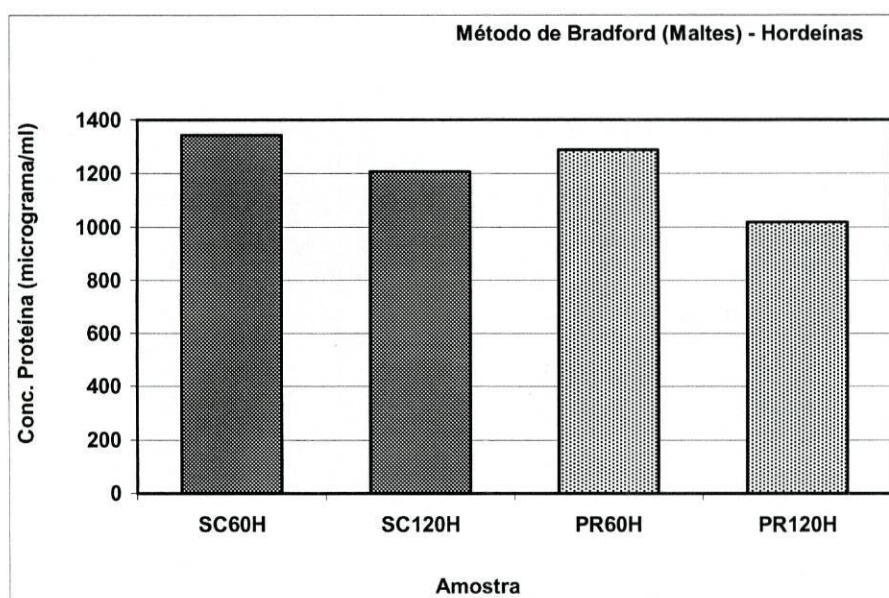


Por observação da figura é possível observar a existência de três grupos bem definidos. Dois deles correspondem ao agrupamento das amostras de mosto, verificando-se, uma vez mais, que os mostos provenientes da variedade Scarlett apresentam maiores quantidades de proteína do que os da variedade Prestige. No terceiro grupo estão agrupadas todas as amostras de cerveja, tanto as filtradas como as cheias, provenientes de uma ou de outra variedade. A utilização quer do mosto Scarlett, quer do mosto Prestige, que apresentavam conteúdos proteicos significativamente diferentes, originou cervejas (filtradas e cheias) com características muito semelhantes entre si.

### 3.3 Método de Bradford

O conteúdo proteico das amostras analisadas por SDS-PAGE foi quantificado pelo método de Bradford (1976). Na Figura 23 estão apresentados os resultados dessa quantificação efectuada em extractos de malte, obtidos pelo método de Schmitt *et al.*, (1989), específico para hordeínas.

As amostras da variedade Scarlett continham maiores quantidades de proteína do que as amostras da variedade Prestige, nos dois tempos de germinação, e, por outro lado, as amostras com 60 horas de germinação continham maiores quantidades de proteína do que as amostras com 120 horas de germinação, em ambas as variedades.



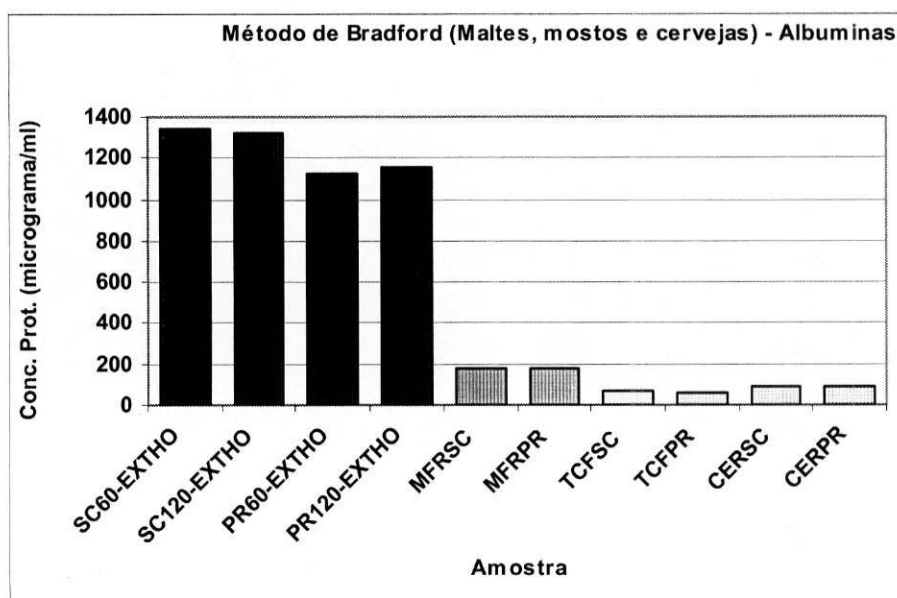
**Figura 23** – Resultados da quantificação do conteúdo proteico dos extractos de malte Scarlett (SC) e Prestige (PR), com 60 (60H) e 120 (120H) horas de germinação, obtidos pelo método de Schmitt *et al.* (1989).

O conteúdo proteico dos extractos de malte obtidos pelos métodos de Kapp e Bamforth (2002) e de Howard *et al.* (1996), específicos para albuminas e outras proteínas solúveis, foi também quantificado. Verificou-se que a



quantidade de proteína extraída pelo método de Howard *et al.* (1996) foi bastante superior (mais de 100% nas amostras de malte Scarlett e nas amostras de malte Prestige com 60 horas de germinação) à quantidade de proteína extraída pelo método de Kapp e Bamforth (2002). Foi ainda possível verificar-se que, em ambos os métodos de extracção, as amostras da variedade Scarlett continham maiores quantidades de proteína do que as amostras da variedade Prestige, nos dois tempos de germinação.

Finalmente, quantificou-se o conteúdo proteico das amostras de mosto e de cerveja. Na Figura 24 estão reunidos os resultados da quantificação do conteúdo proteico dos extractos de malte, obtidos pelo método de Howard *et al.* (1996), dos mostos e das cervejas, podendo-se observar a evolução do conteúdo em proteínas ao longo do processo de produção da cerveja.



**Figura 24** – Resultados da quantificação do conteúdo proteico dos extractos de malte Scarlett (SC) e Prestige (PR), com 60 (60H) e 120 (120H) horas de germinação, obtidos pelo método de Howard *et al.* (1996) (EXTHO) e dos respectivos mostos (MFR), cervejas filtradas (TCF) e cervejas cheias (CER).

A quantidade de proteínas existente nas amostras de mosto, como seria de esperar, era superior à das amostras de cerveja, demonstrando que o processo de fabrico elimina parte do conteúdo proteico. Tanto nos maltes,

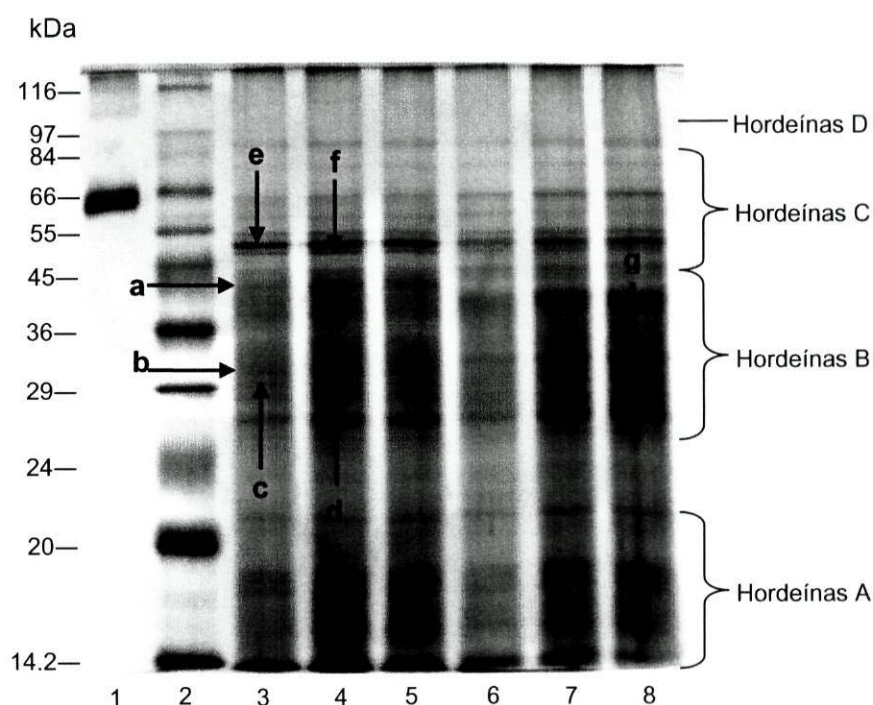
como nos mostos e nas cervejas, não são observadas diferenças consideráveis entre amostras provenientes das duas variedades de cevada.



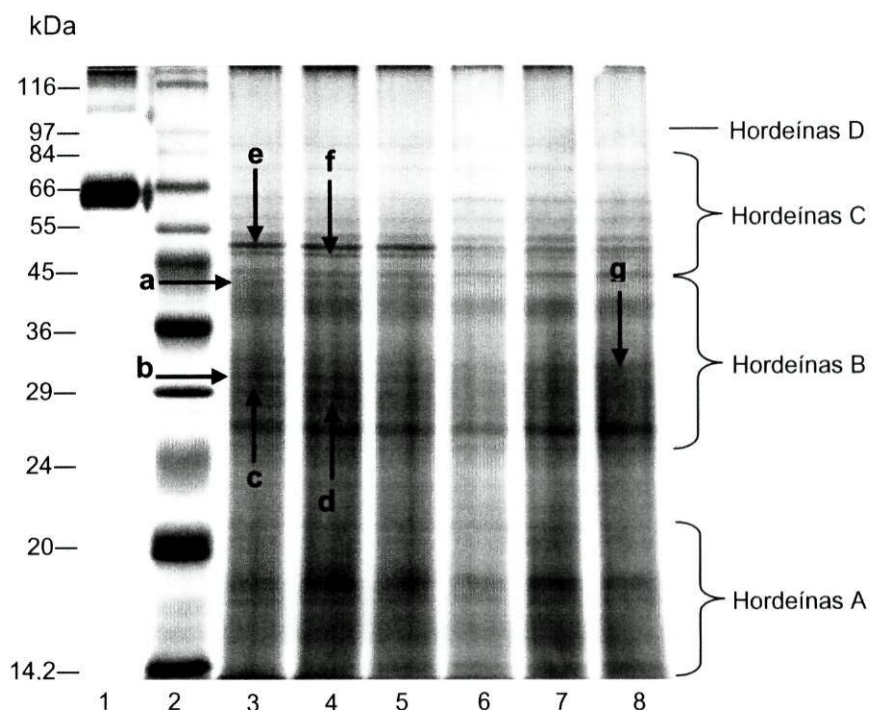
### 3.4 Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio

#### 3.4.1 Amostras de malte

A primeira etapa do estudo dos perfis electroforéticos consistiu na separação das hordeínas das duas variedades de malte. Com o objectivo de averiguar possíveis diferenças relacionadas com a extracção utilizada (Schmitt *et al.*, 1989), foram analisadas amostras extraídas (simultaneamente) das duas variedades de malte, em três dias diferentes. Na Figura 25 e na Figura 26 podem-se observar os géis obtidos na separação das hordeínas de maltes Scarlett e Prestige, com 60 e 120 horas de germinação, respectivamente.



**Figura 25** – SDS-PAGE das hordeínas de maltes Scarlett e Prestige com 60 horas de germinação. (1) BSA; (2) padrões de peso molecular; (3) Scarlett – extracção 1; (4) Scarlett – extracção 2; (5) Scarlett – extracção 3; (6) Prestige – extracção 1; (7) Prestige – extracção 2; (8) Prestige – extracção 3.



**Figura 26** – SDS-PAGE das hordeínas de maltes Scarlett e Prestige com 120 horas de germinação. (1) BSA; (2) padrões de peso molecular; (3) Scarlett – extracção 1; (4) Scarlett – extracção 2; (5) Scarlett – extracção 3; (6) Prestige – extracção 1; (7) Prestige – extracção 2; (8) Prestige – extracção 3.

Os perfis electroforéticos obtidos foram muito semelhantes para os dois tempos de germinação. Contudo, foram detectadas diferenças, entre variedades, nas hordeínas situadas entre os 29 e os 55 kDa, na região das hordeínas B e C. Nos maltes Scarlett, são observadas duas bandas, **a** e **b**, na região das hordeínas B, com cerca de 45 e 29 kDa, respectivamente, não observadas nos maltes Prestige, indicando uma diferença qualitativa. As bandas **c** e **d**, na região das hordeínas B, com cerca de 29 kDa, e as bandas **e** e **f**, na região das hordeínas C, entre os 45 e os 55 kDa, por sua vez, são observadas nas duas variedades de malte, embora apareçam mais intensas na variedade Scarlett, indicando diferenças quantitativas. A banda **g**, existente na região das hordeínas B, entre os 29 e os 36 kDa, é também observada nas duas variedades de malte, aparecendo mais intensa nas amostras de Prestige.

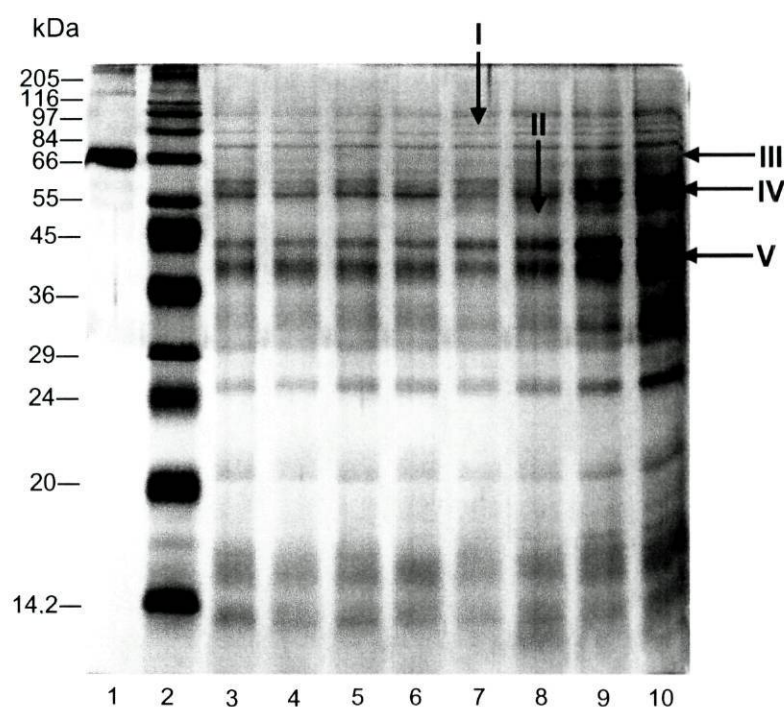
Não foram observadas bandas na zona das hordeínas D. Na zona das hordeínas A não foram observadas quaisquer diferenças entre as amostras.



Em ambos os maltes o perfil electroforético foi semelhante nas três extracções realizadas, não se registando diferenças relacionadas com o método de extracção.

A etapa seguinte do estudo dos perfis electroforéticos consistiu na separação das albuminas e outras proteínas solúveis das duas variedades de malte. Foram testados dois métodos de extracção, descritos por Kapp e Bamforth (2002) e por Howard *et al.* (1996). O segundo método demonstrou ser mais eficaz, uma vez que, além de uma maior quantidade total de proteína (ver ponto 3.3), extraiu também um maior número de proteínas (bandas I e II da Figura 27).

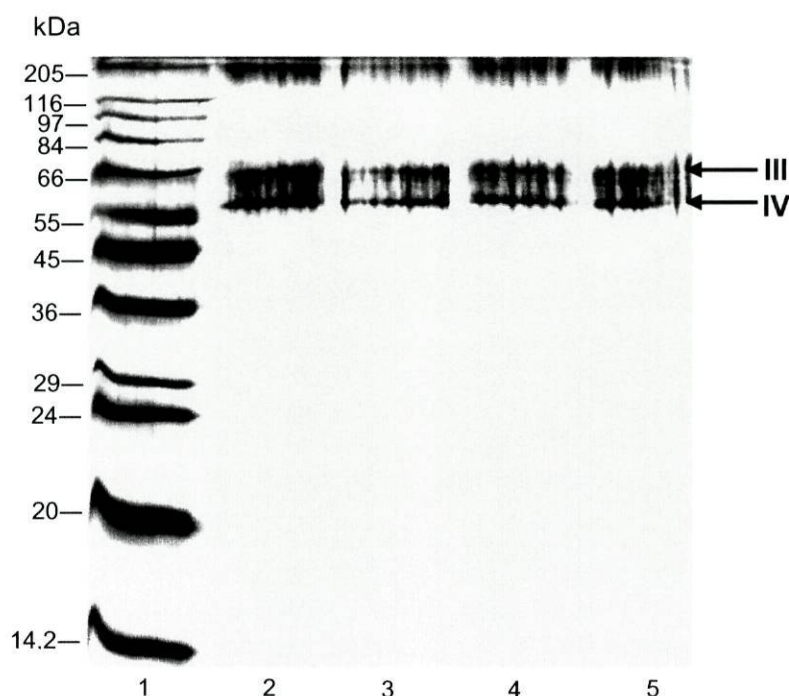
Em ambos os métodos de extracção, não se observaram diferenças entre variedades nem entre tempos de germinação.



**Figura 27** – SDS-PAGE das albuminas e outras proteínas solúveis de maltes Scarlett e Prestige, com 60 e 120 horas de germinação, extraídas por dois métodos diferentes: Kapp e Bamforth, 2002 (KB) e Howard *et al.*, 1996 (HO)]. (1) BSA; (2) padrões de peso molecular; (3) Scarlett 60 horas (extracção KB); (4) Scarlett 120 horas (extracção KB); (5) Prestige 60 horas (extracção KB); (6) Prestige 120 horas (extracção KB); (7) Scarlett 60 horas (extracção HO); (8) Scarlett 120 horas (extracção HO); (9) Prestige 60 horas (extracção HO); (10) Prestige 120 horas (extracção HO).

As bandas **III** e **IV** da Figura 27 correspondem às bandas identificadas com os mesmos números na Figura 28 e são referentes às proteínas existentes nos picos **1** e **2** das separações cromatográficas das amostras de maltes (Figura 6 e Figura 7), segundo as condições de análise das albuminas e outras proteínas solúveis. Por sua vez, a banda **V**, com cerca de 40 kDa, corresponde às bandas indicadas com o mesmo número nos géis dos mostos (Figura 29) e das cervejas (Figura 30).

Na Figura 28 é, então, possível observar o gel obtido na separação das proteínas existentes nas fracções recolhidas durante as separações cromatográficas. Esta electroforese, embora tenha permitido caracterizar as proteínas (cerca de 66 e 55 kDa) correspondentes aos picos **1** e **2** dos cromatogramas, não permitiu observar diferenças entre as duas variedades, nem entre os dois tempos de germinação (ao contrário do método cromatográfico), dado que a concentração proteica era muito baixa. Para a execução desta electroforese foi necessária a recolha de fracções referentes a 13 separações cromatográficas, para cada uma das amostras de malte.



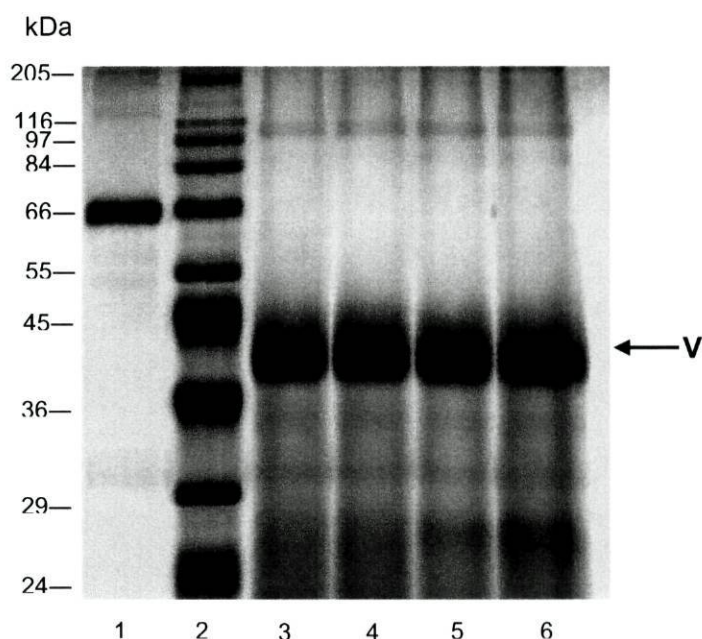
**Figura 28** – SDS-PAGE das fracções proteicas recolhidas de amostras de malte durante a separação cromatográfica das albuminas e outras proteínas solúveis. (1) padrões de peso molecular; (2) Scarlett 60 horas; (3) Prestige 60 horas; (4) Scarlett 120 horas; (5) Prestige 120 horas.



### 3.4.2 Amostras de mosto e cerveja

A etapa seguinte do trabalho teve como objectivo o estudo dos polipeptídeos e proteínas existentes nos mostos obtidos a partir dos dois maltes. Na Figura 29 é possível observar as bandas obtidas na separação electroforética dos mostos Scarlett e dos mostos Prestige. Não foram observadas diferenças entre mostos provenientes de diferentes variedades, nem entre os dois mostos da mesma variedade.

Em todos os mostos foi possível observar uma banda intensa com cerca de 40 kDa (**V**). Eram ainda visíveis outras bandas menos intensas, uma entre os 97 e os 116 kDa e as restantes entre os 24 e os 36 kDa.

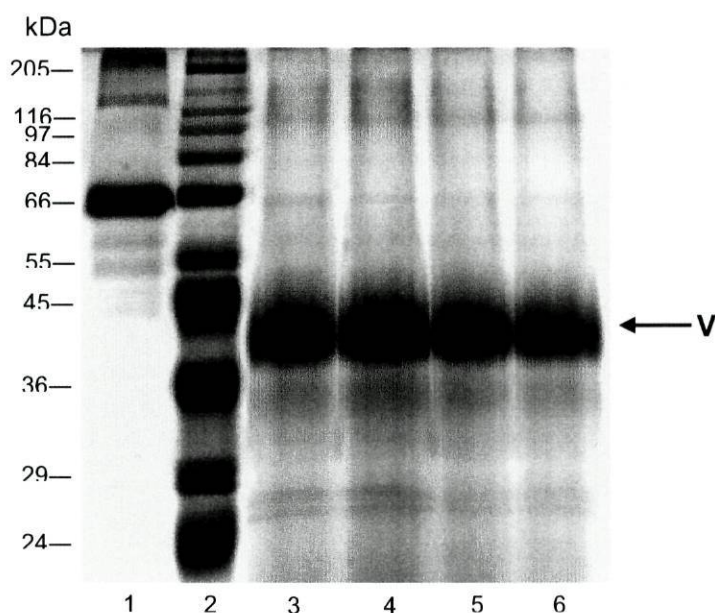


**Figura 29** – SDS-PAGE de mostos frios obtidos a partir de maltes Scarlett e Prestige. (1) BSA; (2) padrões de peso molecular; (3) mosto frio Scarlett – 1; (4) mosto frio Scarlett – 2; (5) mosto frio Prestige – 1; (6) mosto frio Prestige – 2.

A etapa final consistiu no estudo dos polipeptídeos e proteínas existentes nas cervejas (filtrada e cheia) obtidas a partir dos dois mostos. Não foram observadas diferenças entre cervejas provenientes de diferentes variedades de malte, tanto no caso da cerveja filtrada, como no da cerveja cheia (Figura 30). Contudo, observaram-se diferenças na intensidade de várias

bandas, especialmente entre os 24 e os 29 kDa, sendo mais intensas nas amostras de cerveja filtrada.

Em todas as cervejas foi também possível observar uma banda intensa com cerca de 40 kDa (**V**). Tal como aconteceu nos mostos, foram ainda visíveis outras bandas menos intensas, uma entre os 97 e os 116 kDa, outra com cerca de 66 kDa e as restantes entre os 24 e os 36 kDa.



**Figura 30** – SDS-PAGE de cervejas produzidas a partir de maltes Scarlett e Prestige. (1) BSA; (2) padrões de peso molecular; (3) tanque de cerveja filtrada Scarlett; (4) tanque de cerveja filtrada Prestige; (5) cerveja cheia Scarlett; (6) cerveja cheia Prestige.



### 3.5 Caracterização físico-química e sensorial das amostras analisadas

As amostras utilizadas neste trabalho foram sujeitas a diversas análises, realizadas nos laboratórios das empresas MALTIBÉRICA, SA, Poceirão e UNICER – Bebidas de Portugal SGPS, SA, Leça do Balio, de acordo com os métodos do manual Analytica-EBC (1998) da “European Brewery Convention”. Na Tabela 15 estão apresentados os resultados da análise físico-química das variedades de cevada Scarlett e Prestige, utilizadas na produção dos maltes.

**Tabela 15** – Resultados da análise físico-química das cevadas utilizadas na produção dos maltes.

Parâmetro	Unidades	Especificações	Cevada Scarlett	Cevada Prestige
Humidade	%	< 12	11,4	10,9
Azoto total	%	> 9 < 11,5	10,1	9,8
Triagem >2,8 mm	%	> 80	47	48
Triagem >2,5 mm	%		42	40,5
Triagem >2,2 mm	%	—	8,3	8,5
Triagem <2,2 mm	%	< 3	2	2,2
Grão partido	%	< 1,5	0,7	0,8
Viabilidade	%	> 98	100	100

Todos os parâmetros obtidos na análise das duas variedades de cevada encontravam-se de acordo com as especificações.

Os resultados da análise físico-química dos maltes finais, obtidos a partir de cada uma das variedades de cevada, por sua vez, estão apresentados na Tabela 16. Os resultados apresentados são valores médios de três determinações, no caso do malte Scarlett, e de quatro determinações, no caso do Prestige. É importante referir que as condições de maltagem foram mantidas constantes, não se efectuando modificações de optimização, uma vez

que se pretendia estudar possíveis diferenças entre as variedades. Convém ainda salientar que os maltes estudados neste trabalho correspondiam a amostras recolhidas com 60 e 120 horas de germinação e não ao malte final.

**Tabela 16** – Resultados da análise físico-química dos maltes finais obtidos a partir de cada uma das variedades de cevada.

Parâmetro	Unidades	Especificações	Malte Scarlett	Malte Prestige
Humidade	%	4,5 – 5,0	4,3	4,1
Extracto	%	> 80	81,3	83,6
Sacarificação	min	< 15	15,0	15,0
Filtração	min	—	60	60
Cor	discos EBC	3,0 – 4,5	3,4	3,1
Proteína total	%	—	9,80	9,50
Proteína solúvel	%	3,8 – 4,5	4,30	4,20
Índice de Kolbach	%	—	43,6	44,3
Viscosidade	cP	< 1,60	1,59	1,59
Hartong 45°C	%	—	44,2	46,5
pH	—	> 5,8	6,13	6,07
Poder diastásico	WK	> 230	275	274
Azoto $\alpha$ -aminado livre	mg/l	—	135	134
$\beta$ -glucanos	mg/l	100 – 200	183	140
Desagregação	%	85 – 92	94	96
Homogeneidade	%	> 70	77	79
Triagem >2,8 mm	%	—	72,3	83,1
Triagem >2,5 mm	%	—	21,3	13,2
Triagem >2,2 mm	%	—	5,1	2,7
Resíduos	%	< 1,0	1,1	0,8
Grãos partidos	%	—	0,3	0,3
Impurezas	%	—	0,0	0,0
Friabilidade	%	80 – 90	88,9	93,9
Semi-vítreos	%	—	1,1	1,7
Vítreos	%	—	0,3	0,6

Os valores de proteína total e de proteína solúvel apresentados pela variedade de malte Scarlett foram superiores aos da variedade Prestige,



embora ambas as variedades tenham apresentado valores concordantes com as especificações. O extracto obtido para o malte Prestige, por sua vez, pode ser considerado uma característica vantajosa desta variedade, uma vez que foi superior ao obtido para o malte Scarlett.

Os mostos obtidos a partir dos maltes das duas variedades foram também analisados do ponto de vista físico-químico (Tabela 17).

**Tabela 17** – Resultados da análise físico-química dos mostos Scarlett e Prestige.

Parâmetro	Unidades	Mosto Scarlett	Mosto Prestige
Extracto	°P	14,3	14,2
pH	—	5,04	5,06
Cor	EBC	11	10,5
Amargor	U.A.	37	36
Extracto limite	°P	2,18	2,17
Atenuação limite	%	69	69
Azoto aminado livre	mg/l	203	241

Os resultados mais relevantes da análise físico-química e sensorial das cervejas filtradas obtidas a partir de cada um dos mostos, por sua vez, estão apresentados na Tabela 18.

**Tabela 18** – Resultados da análise físico-química e sensorial das cervejas filtradas (TCF) Scarlett e Prestige.

Parâmetro	Unidades	TCF Scarlett	TCF Prestige
Álcool	%(v/v)	5,34	5,37
Extracto real	%(p/p)	4,22	4,09
pH	—	4,52	4,52
Coloração	EBC	6,4	6,1
Amargor	U.A.	23	20
Turvação a 20°C	EBC	0,8	0,9
Análise sensorial	—	Satisfatória	Satisfatória

De uma forma geral, os resultados de ambas as cervejas filtradas encontravam-se dentro das especificações, indicando um desempenho adequado dos dois maltes em estudo.

As cervejas obtidas no final do processo de fabrico foram também analisadas, do ponto de vista físico-químico e sensorial (Tabela 19 e Tabela 20, respectivamente).

**Tabela 19** – Resultados da análise físico-química das cervejas cheias Scarlett e Prestige.

Parâmetro	Unidades	Cerveja Scarlett	Cerveja Prestige
Extracto Primitivo (p/p)	%P	12.22	12.13
Extracto Primitivo (p/v)	%(p/v)	12.80	12.70
Álcool (p/p)	%(p/p)	4.15	4.17
Álcool (v/v)	%(v/v)	5.30	5.32
Extracto Real	%P	4.18	4.05
Extracto Aparente	%P	2.28	2.14
Atenuação Real	%	67	68
pH	—	4.55	4.55
Coloração	EBC	6.3	6.0
Amargor	U.A.	23	21
Turvação a 20°C	EBC	0.7	0.8
Turvação a 0°C	EBC	1.6	1.6
Turvação Total 5d/1	EBC	1.2	1.4
Diacetilo C.G.	mg/l	0.04	0.03
Estabilidade de Espuma	Segundo	245	224
CO <sub>2</sub>	g/l	5.1	5.0
SO <sub>2</sub> Total	mg/l	16	19
Azoto aminado livre	mg/l	149	139
Polifenóis Totais	mg/l	112	125

Os resultados da análise físico-química das cervejas finais, de uma forma geral, encontravam-se dentro das especificações, não se observando diferenças consideráveis entre as duas cervejas. O valor da estabilidade da espuma, no entanto, é normal no caso das cervejas Scarlett, podendo ser considerado baixo nas cervejas Prestige.



Na análise sensorial das cervejas cheias, as amostras foram submetidas a dois tipos de prova: um controlo organoléptico e uma descrição do perfil aromático. Como referido no ponto 2.5, o “score” para o controlo organoléptico baseou-se numa escala de defeitos, de 1 (sem quaisquer defeitos assinaláveis) a -3 (com defeitos graves).

**Tabela 20** – Resultados da análise sensorial das cervejas cheias Scarlett e Prestige.

<b>Controlo organoléptico</b>	<b>Cerveja Scarlett</b>	<b>Cerveja Prestige</b>
Cerveja fresca	-0,1	-0,1
Cerveja 1 semana (37°C)	-0,5	-0,6
<b>Descrição do perfil aromático</b>	Ligeiramente adstringente; Ligeiramente com ácidos gordos	Ligeiramente metálico; Ligeiramente adstringente; Ligeiramente aguado

## **4 Discussão e conclusões**



O objectivo deste trabalho, como referido anteriormente, consistiu na caracterização de duas variedades de cevada nacional, Scarlett e Prestige, através da realização de um estudo comparativo dos perfis cromatográficos, obtidos por RP-HPLC/UV, e electroforéticos, obtidos por SDS-PAGE, das proteínas existentes nos maltes e nos respectivos mostos e cervejas.

Através da caracterização físico-química das amostras utilizadas neste estudo, realizada nos laboratórios das empresas MALTIBÉRICA e UNICER, verificou-se que no caso das cevadas propriamente ditas, a variedade Scarlett apresentava uma maior quantidade de azoto total (10,1%) do que a variedade Prestige (9,8%). No caso dos maltes, os provenientes da variedade Scarlett continham maiores quantidades de proteína total (9,8%) e de proteína solúvel (4,3%) do que os maltes Prestige (9,5% e 4,2%, respectivamente). Embora as diferenças entre as amostras não sejam consideráveis, são, contudo, coerentes com os resultados obtidos neste trabalho. Com a quantificação do conteúdo proteico total, verificou-se que a quantidade de hordeínas, extraídas pelo método de Schmitt *et al.* (1989), foi mais elevada nos maltes Scarlett do que nos maltes Prestige com o mesmo tempo de germinação, o mesmo acontecendo no caso das albuminas e outras proteínas solúveis, extraídas pelos métodos de Howard *et al.* (1996) e Kapp e Bamforth (2002). Segundo alguns autores, a cevada utilizada para maltagem deve ter baixo conteúdo em proteínas, uma vez que a sua quantidade total se correlaciona negativamente com o extracto do respectivo malte (Peltonen *et al.*, 1994; Howard *et al.*, 1996; Fox *et al.*, 2002). De facto, observando os resultados da caracterização físico-química, foi possível verificar-se que o extracto obtido para o malte Prestige (83,6%) foi superior ao do malte Scarlett (81,3%). De acordo com Peltonen *et al.* (1994), uma elevada quantidade de proteína total dificulta o acesso dos grãos de amido às amilases. Por outro lado, e ainda segundo estes investigadores, um menor teor de azoto nos grãos está relacionado com boa qualidade de maltagem. Na variedade Prestige foram encontrados, para além de um inferior conteúdo proteico, menores teores de azoto, características que poderão ser consideradas vantajosas em relação à variedade Scarlett.

## Hordeínas

Relativamente à quantificação, pelo método de Bradford (1976), das hordeínas extraídas das amostras de malte, observou-se que a sua quantidade diminuía, em ambas as variedades, das 60 para as 120 horas de germinação, o que sugere a existência de degradação das hordeínas durante o processo germinativo. Este fenómeno tem sido referido por vários investigadores (Tsuchiya *et al.*, 1995; Chandra *et al.*, 1999; Osman *et al.*, 2001; Kihara *et al.*, 2002; Osman *et al.*, 2002; Fox *et al.*, 2002; Osman, 2003; Osman *et al.*, 2003). Estas observações estão ainda de acordo com os resultados obtidos a partir do método de RP-HPLC (associado ao tratamento estatístico), que permitiu observar que, das 60 para as 120 horas de germinação, ocorreu uma diminuição do conteúdo das proteínas existentes nos picos mais hidrofóbicos (6, 7, 8 e 9).

A degradação das hordeínas durante a maltagem, que é realizada por endoproteases, dá origem a peptídeos. Os resultados obtidos na separação das hordeínas, por RP-HPLC, indicam que das 60 para as 120 horas de germinação, em ambas as variedades, houve um aumento dos picos mais hidrofílicos 3, 4 e 5, que sugere serem estes os peptídeos resultantes da degradação das hordeínas, existentes nos picos mais hidrofóbicos. Os perfis cromatográficos obtidos por Schmitt *et al.* (1989) e por Lookhart *et al.* (1999) estão correlacionados com os nossos resultados. Estes investigadores utilizaram a mesma técnica cromatográfica (RP-HPLC) e os mesmos eluentes (água e acetonitrilo, ambos adicionados com 0,1% de TFA) usados neste trabalho, embora com gradientes diferentes. As hordeínas C eluíam com uma proporção de acetonitrilo de cerca de 40% (Schmitt *et al.*, 1989) ou de 45% (Lookhart *et al.*, 1999). No presente trabalho, o pico que eluiu com a proporção de acetonitrilo de 40% foi o 6, que, na realidade, poderá ser constituído por várias proteínas pertencentes ao grupo das hordeínas C. As hordeínas B, por sua vez, eluíam posteriormente, com uma proporção de acetonitrilo de cerca de 45% (Schmitt *et al.*, 1989) ou de 50% (Lookhart *et al.*, 1999). Analogamente, o pico 7, do nosso trabalho, poderá ser constituído por várias proteínas pertencentes ao grupo das hordeínas B. A quantidade de proteínas, existente nos picos 6, das amostras de malte Scarlett foi significativamente superior à



existente nas amostras de malte Prestige ( $p = 0,003$  nas 60 horas de germinação;  $p = 0,024$  nas 120 horas de germinação), o mesmo acontecendo no caso do pico 7 ( $p = 0,000$ , em ambos os tempos de germinação). Essa diferença observada entre as duas variedades está de acordo com os resultados da separação de hordeínas por SDS-PAGE, onde o malte Scarlett apresenta maior intensidade e maior número de bandas entre os 29 e os 55 kDa, na região das hordeínas B e C. Segundo Howard *et al.* (1996), elevadas quantidades de Hordeínas B e/ou C correlacionam-se negativamente com os valores de extracto, reforçando o que foi anteriormente referido em relação à diferença entre as duas variedades, no que diz respeito a este parâmetro físico-químico (81,3% para o malte Scarlett, 83,6% para o malte Prestige).

Nos trabalhos de Schmitt *et al.* (1989) e de Lookhart *et al.* (1999) não se observaram quaisquer picos que pudessem corresponder aos picos 1, 2, 3, 4 e 5. É importante referir que as amostras analisadas por estes investigadores não eram de malte, mas sim de cevada, onde as referidas degradações proteicas não teriam ainda ocorrido, o que vem reforçar a ideia de que estes picos correspondem a fragmentos de hordeínas.

Segundo Bamforth e Milani (2004), as hordeínas, na forma não hidrolisada, diminuem a capacidade dos polipeptídeos derivados das albuminas para estabilizar a espuma da cerveja. No entanto, certos autores referem que alguns polipeptídeos, derivados da fragmentação das hordeínas, têm influência positiva na espuma da cerveja (Sørensen *et al.*, 1993; Vaag *et al.*, 1999; Kapp e Bamforth, 2002; Bamforth e Kanauchi, 2003). Atendendo ao facto de que os picos 3, 4 e 5, da separação cromatográfica das hordeínas, poderão corresponder aos polipeptídeos resultantes da degradação das hordeínas mais hidrofóbicas, é importante referir que a maior quantidade destes picos, verificada na variedade Scarlett, poderá estar relacionada com o superior valor de estabilidade de espuma, observado na respectiva cerveja (245 segundos, para 224 na cerveja Prestige).

O método electroforético de separação de hordeínas utilizado neste trabalho, embora tenha permitido detectar diferenças qualitativas e quantitativas entre as duas variedades de malte, não permitiu observar diferenças entre os dois tempos de germinação. Assim sendo, a sua aplicação



no estudo da evolução das hordeínas ao longo da germinação parece não ser adequada.

A SDS-PAGE tem sido utilizada no estudo das hordeínas, com o objectivo de identificar diferentes variedades de cevada (Villiers e Laubscher, 1989). Além disso, é também usada, em amostras de cevada, na determinação da sua qualidade de maltagem (Peltonen *et al.*, 1994; Howard *et al.*, 1996; Brennan *et al.*, 1998; Echart-Almeida e Cavalli-Molina, 2001; Molina-Cano *et al.*, 2001). O procedimento electroforético utilizado demonstrou ter potencialidades para ser aplicado, em amostras de cevada, com os objectivos acima referidos.

### **Albuminas e outras proteínas solúveis**

A quantificação das proteínas extraídas das amostras de malte, através dos métodos de Kapp e Bamforth (2002) e de Howard *et al.* (1996), permitiu observar que existe uma maior quantidade nas amostras provenientes da variedade Scarlett. Num trabalho de quantificação, através do método ELISA, dos níveis de proteínas com capacidade estabilizadora de espuma (que são maioritariamente albuminas), Ishibashi *et al.* (1997) verificaram também diferenças entre diversas variedades de malte. As diferenças verificadas entre as variedades de malte são explicadas, possivelmente, pelos níveis dessas proteínas na cevada original, que, por sua vez, dependerão da própria variedade utilizada, do país e da zona onde esta foi cultivada e das condições de cultivo e de armazenamento.

A partir dos dados obtidos com a separação cromatográfica das albuminas e outras proteínas solúveis, associada à Análise de Componentes Principais, verificou-se que, nas duas variedades de malte estudadas, as amostras com 120 horas de germinação continham maiores quantidades de proteínas do que as amostras com 60 horas de germinação, sugerindo a síntese destas proteínas ao longo do processo germinativo. No entanto, alguns autores referem que as proteínas e os peptídeos solúveis em água aumentam durante a maltagem, como resultado da libertação de proteínas latentes e da degradação das hordeínas insolúveis (Evans e Hejgaard, 1999; Osman *et al.*, 2001; Osman *et al.*, 2002; Osman *et al.*, 2003). O pico **G5** da separação

cromatográfica das albuminas e outras proteínas solúveis, que aumenta, em ambas as variedades, das 60 para as 120 horas de germinação, poderá corresponder aos referidos peptídeos solúveis. Este pico eluiu com uma percentagem de acetonitrilo de cerca de 30%. No caso da separação cromatográfica das hordeínas, os picos que eluíram com uma percentagem semelhante de acetonitrilo foram os **3**, **4** e **5**, o que reforça o que foi dito, anteriormente, em relação à natureza destes picos. O método de extracção de albuminas e outras proteínas solúveis utilizado (Howard *et al.*, 1996) poderá ter extraído, também, os peptídeos hidrofílicos resultantes da degradação das hordeínas.

Relativamente ao estudo das albuminas e outras proteínas solúveis, das amostras de malte, por SDS-PAGE, não foi obtida qualquer diferença entre variedades, nem entre tempos de germinação. Foi possível, contudo, detectar uma banda intensa (**V**), com cerca de 40 kDa (também observada, posteriormente, nas amostras de mosto e de cerveja), correspondente à proteína Z, referida inúmeras vezes na literatura (Hejgaard e Kaersgaard, 1983; Sørensen *et al.*, 1993; Curioni *et al.*, 1995; Leiper *et al.*, 2003).

A maior quantidade de albuminas, assim como de peptídeos hidrofílicos, resultantes da degradação das hordeínas hidrofóbicas, existente nas amostras da variedade Scarlett poderá estar relacionada com a sua maior estabilidade de espuma (245 segundos, para 224 na cerveja Prestige). É importante referir que tanto a proteína Z como a LTP1, proteínas com influência positiva na qualidade da espuma, são albuminas (Sørensen *et al.*, 1993; Gibson *et al.*, 1995; Jégou *et al.*, 2000).

A SDS-PAGE das fracções recolhidas, a partir da separação por RP-HPLC, das albuminas e outras proteínas solúveis das amostras de malte, embora tenha permitido caracterizar as proteínas existentes em dois picos cromatográficos específicos (**1** e **2**), não foi capaz de diferenciar variedades nem tempos de germinação. Os referidos picos correspondem a uma banda (**III**) com cerca de 66 kDa, também detectada por Mohan *et al.* (1992) em amostras de malte, e a outra (**IV**) com cerca de 55 kDa. As vantagens deste procedimento poderão ser mais exploradas, em trabalhos futuros, desde que se utilize um método mais eficaz para concentrar as proteínas recolhidas, como são exemplos a precipitação ou a liofilização.



No que diz respeito ao estudo das proteínas existentes nas amostras de mosto, a quantificação do seu conteúdo proteico total não evidenciou diferenças consideráveis, entre amostras obtidas a partir de maltes das duas variedades. A separação das proteínas por SDS-PAGE, por sua vez, também não detectou diferenças entre mostos provenientes das duas variedades. Foi, contudo, possível observar uma banda intensa, com cerca de 40 kDa, correspondente à proteína Z. Foram ainda observadas outras bandas menos intensas, não referidas na literatura, uma entre os 97 e os 116 kDa e as restantes entre os 24 e os 36 kDa. Num estudo electroforético de amostras de mosto, Kordialik-Bogacka e Ambroziak (2004) referiram a existência de uma banda com 66 kDa, não observada nas condições electroforéticas utilizadas.

Relativamente à separação das proteínas por RP-HPLC, foram observadas diferenças quantitativas significativas entre os dois mostos ( $p = 0,000$ ), tendo o mosto Scarlett quantidades de proteína superiores às encontradas no mosto Prestige. Durante a brassagem, deverá ter ocorrido uma maior extracção de proteínas hidrofílicas a partir da variedade de malte Scarlett, uma vez que aquelas se encontravam em maior quantidade nesta variedade.

Finalmente, no que diz respeito às proteínas existentes nas amostras de cerveja, com a quantificação do conteúdo proteico total, não se verificaram diferenças consideráveis entre amostras provenientes das duas variedades. Por outro lado, através da comparação dos perfis electroforéticos, observaram-se diferenças na intensidade de algumas bandas, especialmente entre os 24 e os 29 kDa. Estas bandas apareciam mais intensas nas amostras de cerveja filtrada, o que sugere a existência de eliminação proteica durante a estabilização biológica da cerveja, ou durante o armazenamento do produto final. Em todas as amostras de cerveja, foi possível observar uma banda intensa, com cerca de 40 kDa, correspondente à proteína Z. Embora seja referido que as proteínas existentes na cerveja se encontram entre os 10 e os 40 kDa (Leiper *et al.*, 2003), no presente trabalho detectaram-se, ainda, proteínas de maior peso molecular. Ao contrário da banda com cerca de 66 kDa, também detectada por Mohan *et al.* (1992) em amostras de cerveja, a observada entre os 97 e os 116 kDa não se encontra referida na literatura.

Osman *et al.* (2003) sugerem que as proteínas de elevado peso molecular, encontradas nas amostras de mosto e de cerveja, poderão ser formadas por combinação de peptídeos, resultante da oxidação de grupos sulfidrílo e/ou de derivados fenólicos. Por sua vez, Sheehan e Skerritt (1997) detectaram polipeptídeos na cerveja, com mais de 50 kDa, que foram reconhecidos por anticorpos específicos para os agregados das hordeínas B e D da cevada. Assim sendo, é possível que os polipeptídeos de elevado peso molecular encontrados na cerveja resultem da combinação de peptídeos hidrofílicos, derivados da degradação das hordeínas D e B.

Através da separação electroforética não foram observadas diferenças entre variedades, tanto nas cervejas filtradas, como nas cervejas cheias. Por sua vez, a partir da separação cromatográfica observaram-se algumas diferenças entre variedades, tendo as amostras Scarlett, de uma forma geral, maior quantidade de proteínas. Como anteriormente referido, essas diferenças poderão ter influência na maior estabilidade de espuma encontrada nas cervejas cheias Scarlett (245 segundos, para 224 na cerveja Prestige). Contudo, é também importante referir que o conteúdo em  $\beta$ -glucanos, conhecidos por aumentar a viscosidade da cerveja (Lusk *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 1999a; Evans *et al.*, 1999b) e, assim, melhorar a estabilidade da espuma, foi maior nos maltes Scarlett (183mg/l) do que nos maltes Prestige (140mg/l). Os iso- $\alpha$ -ácidos, em interacção com os polipeptídeos da cerveja, também apresentam influência positiva na estabilização da espuma (Bamforth *et al.*, 1993; Bamforth e Kanauchi, 2003). Será, assim, pertinente acrescentar que o valor de amargor, directamente relacionado com o conteúdo em iso- $\alpha$ -ácidos, obtido para a cerveja Scarlett (23 U.A.) foi também superior ao obtido para a cerveja Prestige (21 U.A.).

A Análise de Componentes Principais, dos dados obtidos com a separação cromatográfica dos mostos e das cervejas, permitiu verificar que quer o mosto Scarlett, quer o Prestige, que apresentavam conteúdos proteicos significativamente diferentes, originaram cervejas (filtradas e cheias) com características idênticas. Além disso, os valores obtidos com a caracterização físico-química das cervejas cheias encontravam-se, de uma forma geral, dentro das especificações, não se observando diferenças consideráveis entre cervejas



produzidas a partir das duas variedades de malte. Pode-se, então, concluir que quer a variedade de malte Scarlett, quer a Prestige, podem ser utilizadas para produzir cervejas semelhantes, do ponto de vista da fracção proteica.

O único parâmetro físico-químico em que a diferença observada, entre cervejas produzidas a partir das duas variedades de malte, pode ser considerada relevante é o da estabilidade da espuma. Uma das explicações para um baixo valor de estabilidade da espuma é o contacto, demasiadamente longo, entre a levedura e a cerveja. Esta eventualidade pode ter como resultado a autólise da levedura e consequente libertação de proteases, capazes de degradar as proteínas com influência positiva na espuma. Segundo Kapp e Bamforth (2002), a protease A da levedura é capaz de hidrolisar tanto a fracção das hordeínas, como a das albuminas. O baixo valor de estabilidade da espuma, encontrado na cerveja Prestige, poderá ser contornado, efectuando alterações no processo de maltagem, de forma a regular a modificação proteica da cevada. Além disso, na produção industrial da cerveja são utilizadas, pelo menos, duas variedades de malte, o que permite que alguma característica menos satisfatória (de uma variedade) seja compensada pela(s) restante(s) variedade(s). Caso seja necessário, poder-se-á ainda recorrer à utilização do alginato de propilenoglicol, aditivo tecnológico muito usado para aumentar a hidrofobicidade dos polipeptídeos, melhorando, assim, a estabilidade da espuma (Bamforth, 1995).

A variedade de cevada Prestige tem a vantagem de apresentar bom rendimento agronómico e elevada resistência a pragas. Assim sendo, e tendo em conta os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que esta variedade reúne todas as condições para ser utilizada na produção industrial de cerveja.

## **5 Bibliografia**



- 
- Analytica-EBC – fifth edition, (1998), European Brewery Convention, Verlag Hans Carl Getränke – Fachverlag, ISBN 3-418-00759-7, Nürnberg.
  - Anness, B. J., Reed, R. J. R., (1985a), "Lipids in the brewery – A material balance", *J. Inst. Brew.*, 91, pp. 82-87.
  - Anness, B. J., Reed, R. J. R., (1985b), "Lipids in wort", *J. Inst. Brew.*, 91, pp. 313-317.
  - Asano, K., Hashimoto, N., (1980), "Isolation and characterization of foaming proteins of beer", *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 38:4, pp. 129-137.
  - Bamforth, C. W., (1985), "The foaming properties of beer", *J. Inst. Brew.*, 91, pp. 370-383.
  - Bamforth, C. W., Canterranne, E., Chandley, P., Onishi, A., (1993), "The molecular interactions of beer foam", pp. 331-340 in *Proc. 24<sup>th</sup> Congr. Eur. Brew. Conv., Oslo*.
  - Bamforth, C. W., (1995), "Foam: Method, Myth or Magic?", *Brewer*, 81, pp. 396-399.
  - Bamforth, C. W., (1999), "Bringing matters to a head: the status of research on beer foam", in *Eur. Brew. Conv.: Symposium on Beer Foam Quality*, 27, pp. 10-21.
  - Bamforth, C. W., Kanauchi, M., (2003), "Interactions between polypeptides derived from barley and other beer components in model foam systems", *J. Sci. Food Agric.*, 83, pp. 1045-1050.
  - Bamforth, C. W., Milani, C., (2004), "The foaming of mixtures of albumin and hordein protein hydrolysates in model systems", *J. Sci. Food Agric.*, 84, pp. 1001-1004.
  - Bech, L. M., Vaag, P., Heinemann, B., Breddam, K., (1995), "Throughout the brewing process barley lipid transfer protein 1 (LTP1) is transformed into a more foam-promoting form", pp. 561-568 in *Proc. 25<sup>th</sup> Congr. Eur. Brew. Conv., Brussels*.
  - Borén, M., Larsson, H., Falk, A., Jansson, C., (2004), "The barley starch granule proteome – internalised granule polypeptides of the mature endosperm", *Plant Sci.*, 166, pp. 617-626.
  - Bradford, M. M., (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, 72, pp. 248-254.
-

- Brennan, C. S., Smith, D. B., Harris, N., Shewry, P. R., (1998), "The production and characterisation of *Hor* 3 null lines of barley provides new information on the relationship of D hordein to malting performance", *J. Cereal Sci.*, 28, pp. 291-299.
- Chandra, G. S., Proudlove, M. O., Baxter, E. D., (1999), "The structure of barley endosperm – an important determinant of malt modification", *J. Sci. Food Agric.*, 79:1, pp. 37-46.
- Clark, D. C., Wilde, P. J., Marion, D., (1994), "The protection of beer foam against lipid-induced destabilization", *J. Inst. Brew.*, 100, pp. 23-25.
- Cooper, D. J., Husband, F. A., Mills, E. N. C., Wilde, P. J., (2002), "Role of beer lipid-binding proteins in preventing lipid destabilization of foam", *J. Agric. Food Chem.*, 50, pp. 7645-7650.
- Curioni, A., Pressi, G., Furegon, L., Peruffo, A. D. B., (1995), "Major proteins of beer and their precursors in barley: electrophoretic and Immunological studies", *J. Agric. Food Chem.*, 43, pp. 2620-2626.
- Dale, C. J., Young, T. W., (1987), "Rapid methods for determining the high molecular weight polypeptide components of beer", *J. Inst. Brew.*, 93, pp. 465-467.
- Dale, C. J., Young, T. W., Brewer, S., (1989), "Amino acid analysis of beer polypeptides", *J. Inst. Brew.*, 95, pp. 89-97.
- Davy, A., Svendsen, I., Sørensen, S. O., Sørensen, M. B., Rouster, J., Meldal, M., Simpson, D. J., Cameron-Mills, V., (1998), "Substrate specificity of barley cysteine endoproteases EP-A and EP-B", *Plant Physiol.*, 117, pp. 255-261.
- Davy, A., Svendsen, I., Bech, L., Simpson, D. J., Cameron-Mills, V., (1999), "LTP is not a cysteine endoprotease inhibitor in barley grains", *J. Cereal Sci.*, 30, pp. 237-344.
- Davy, A., Sørensen, M. B., Svendsen, I., Cameron-Mills, V., Simpson, D. J., (2000), "Prediction of protein cleavage sites by the barley cysteine endoproteases EP-A and EP-B based on the kinetics of synthetic peptide hydrolysis", *Plant Physiol.*, 122, pp. 137-145.
- Douliez, J.-P., Michon, T., Elmorjani, K., Marion, D., (2000), "Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels", *J. Cereal Sci.*, 32, pp. 1-20.
- Douma, A. C., Bos, M. A., Mocking-Bode, H. C. M., Angelino, S. A. G. F., (1997), "Identification of foam-stabilizing proteins under conditions of normal beer dispense and their biochemical and physico-chemical properties", pp. 671-679 in *Proc. 26<sup>th</sup> Congr. Eur. Brew. Conv.*, Maastricht.



- 
- Echart-Almeida, C., Cavalli-Molina, S., (2001), "Hordein polypeptide patterns in relation to malting quality in Brazilian barley varieties", *Pesq. Agropec. Bras.*, 36, pp. 211-217.
  - Evans, D.E., Hejgaard, J., (1999), "The impact of malt derived proteins on beer foam quality. Part I: The effect of germination and kilning on the level of protein Z4, protein Z7 and LTP1", *J. Inst. Brew.*, 105, pp. 159-169.
  - Evans, D. E., Sheehan, M. C., Stewart, D. C., (1999a), "The impact of malt derived proteins on beer foam quality. Part II: The influence of malt foam-positive proteins and non-starch polysaccharides on beer foam quality", *J. Inst. Brew.*, 105:2, pp. 171-177.
  - Evans, D. E., Nischwitz, R., Stewart, D. C., Cole, N., MacLeod, L. C., (1999b), "The influence of malt foam-positive proteins and non-starch polysaccharides on beer foam quality", in *Eur. Brew. Conv.: Symposium on Beer Foam Quality*, 27, pp. 114-125.
  - Evans, D. E., Sheehan, M., Robinson, L., Hill, A., Tolhurst, R., Gale, K., Barr, A., (2001), "The influence of protein composition on beer haze and foam stability", in *Proc. 10<sup>th</sup> Australian Barley Technical Symposium*.
  - Evans, D. E., Sheehan, M. C., (2002), "Don't be fobbed off: the substance of beer foam – A review", *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 60:2, pp. 47-57.
  - Ferreira, I. M. P. L. V. O., Jorge, K., Nogueira, L. C., Silva, F., Trugo, L. C., (2005), "Effects of the combination of hydrophobic polypeptides, iso- $\alpha$ -acids, and malto-oligosaccharides on beer foam stability", *J. Agric. Food Chem.*, 53, pp. 4976-4981.
  - Finnie, C., Melchior, S., Roepstorff, P., Svensson, B., (2002), "Proteome analysis of grain filling and seed maturation in barley", *Plant Physiol.*, 129, pp. 1308-1319.
  - Fox, G. P., Onley-Watson, K., Osman, A. (2002), "Multiple linear regression calibrations for barley and malt protein based on the spectra of hordein", *J. Inst. Brew.*, 108:2, pp. 155-159.
  - Furukubo, S., Shobayashi, M., Fukui, N., Isoe, A., Nakatani, K., (1993), "A new factor which affects the foam adhesion of beer", *MBAA Tech. Q.*, 30, pp. 155-158.
  - Gibson, C. E., Evans, D. E., Proudlove, M. O., (1995), "Protein Z4 and beer foam", *Ferment*, 9, pp. 81-84.
  - Han, J.-Y., (2000), "Structural characteristics of arabinoxylan in barley, malt, and beer", *Food Chemistry*, 70, pp. 131-138.
  - Hejgaard, J., (1982), "Purification and properties of protein Z – A major albumin of barley endosperm", *Physiol. Plant.*, 54, pp. 174-182.
-



- 
- Hejgaard, J., Kaersgaard, P., (1983), "Purification and properties of the major antigenic beer protein of barley origin", *J. Inst. Brew.*, 89, pp. 402-410.
  - Hollemans, M., Tonies, A. R. J. M., (1989), "The role of specific proteins in beer foam", pp. 561-568 in *Proc. 22<sup>nd</sup> Congr. Eur. Brew. Conv.*, Zurich.
  - Howard, K. A., Gayler, K. R., Eagles, H. A., Halloran, G. M., (1996), "The relationship between D hordein and malting quality in barley", *J. Cereal Sci.*, 24, pp. 47-53.
  - Hughes, P. S., (1996), "Preparative regime for the purification of bitter acids derived from hops (*Humulus lupulus* L.)", *J. Chrom. A*, 731, pp. 327-330.
  - Hughes, P. S., (1999), "Hydrophobic interactions and their significance for beer foam quality", in *Eur. Brew. Conv.: Symposium on Beer Foam Quality*, 27, pp. 158-163.
  - Hughes, P. S., Mills, C., Kauffman, J., Brierley, E., Dickie, K., Proudlove, M., Onishi, A., Wilde, P., (1999), "The foaming and interfacial behaviour of beer polypeptides: the effect of hydrophobicity", in *Eur. Brew. Conv.: Symposium on Beer Foam Quality*, 27, pp. 129-138.
  - Hughes, P. S., Baxter, E. D., (2001a), "Beer quality and the importance of visual cues", in *Beer: quality, safety and nutritional aspects*, (The Royal Society of Chemistry), ISBN 0-85404-588-0, pp. 14-39, Cambridge.
  - Hughes, P. S., Baxter, E. D., (2001b), "Flavour determinants on beer quality", in *Beer: quality, safety and nutritional aspects*, (The Royal Society of Chemistry), ISBN 0-85404-588-0, pp. 40-73, Cambridge.
  - Hughes, P. S., Baxter, E. D., (2001c), "Nutritional aspects of beer", in *Beer: quality, safety and nutritional aspects*, (The Royal Society of Chemistry), ISBN 0-85404-588-0, pp. 98-119, Cambridge.
  - Hughes, P. S., Baxter, E. D., (2001d), "Assuring the safety of beer", in *Beer: quality, safety and nutritional aspects*, (The Royal Society of Chemistry), ISBN 0-85404-588-0, pp. 120-135, Cambridge.
  - Ishibashi, Y., Terano, Y., Fukui, N., Honbou, N., Kakui, T., Kawasaki, S., Nakatani, K., (1996), "Development of a new method for determining beer foam and haze proteins by using the immunochemical method ELISA", *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 54:3, pp. 177-182.
  - Ishibashi, Y., Kakui, T., Terano, Y., Hon-No, E., Kogin, A., Nakatani, K., (1997), "Application of ELISA to quantitative evaluation of foam-active protein in the malting and brewing processes", *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 55:1, pp. 20-23.
  - Jégou, S., Douliez, J.-P., Mollé, D., Boivin, P., Marion, D., (2000), "Purification and structural characterization of LTP1 polypeptides from beer", *J. Agric. Food Chem.*, 48, pp. 5023-5029.
-



- 
- Jones, B. L., Marinac, L. A., (1997), "Purification, identification, and partial characterization of a barley protein that inhibits green malt endoproteinases", *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 55:2, pp. 58-64.
  - Kaersgaard, P., Hejgaard, J., (1979), "Antigenic beer macromolecules – An experimental survey of purification methods", *J. Inst. Brew.*, 85, pp. 103-111.
  - Kapp, G. R., Bamforth, C. W., (2002), "The foaming properties of proteins isolated from barley", *J. Sci. Food Agric.*, 82, pp. 1276-1281.
  - Kihara, M., Saito, W., Okada, Y., Kaneko, T., Asakura, T., Ito, K., (2002), "Relationship between proteinase activity during malting and malt quality", *J. Inst. Brew.*, 108:3, pp. 371-376.
  - Kordialik-Bogacka, E., Ambroziak, W., (2004), "Investigation of foam-active polypeptides during beer fermentation", *J. Sci. Food Agric.*, 84, pp. 1960-1968.
  - Kristoffersen, H. E., Flengrud, R., (2000), "Separation and characterization of basic barley seed proteins", *Electrophoresis*, 21, pp. 3693-3700.
  - Laemmli, U. K., (1970), "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 227, pp. 680-685.
  - Leiper, K. A., Stewart, G. G., McKeown, I. P., (2003), "Beer polypeptides on silica gel. Part II. Polypeptides involved in foam formation", *J. Inst. Brew.*, 109, pp. 73-79.
  - Lindorff-Larsen, K., Winter, J. R., (2001), "Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases", *FEBS Lett.*, 488:3, pp. 145-148.
  - Lookhart, G. L., Bean, S. R., Jones, B. L., (1999), "Separation and characterization of barley (*Hordeum vulgare* L.) hordeins by free zone capillary electrophoresis", *Electrophoresis*, 20, pp. 1605-1612.
  - Lusk, L. T., Cronan, C. L., Chicoye, E., Goldstein, H., (1987), "A surface-active fraction isolated from beer", *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 45:3, pp. 91-95.
  - Lusk, L. T., Goldstein, H., Ryder, D., (1995), "Independent role of beer proteins, melanoidins and polysaccharides in foam formation", *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 53:3, pp. 93-103.
  - Lusk, L. T., Ting, P., Goldstein, H., Ryder, D., Navarro, A., (1999), "Foam tower fractionation of beer proteins and bittering acids", in *Eur. Brew. Conv.: Symposium on Beer Foam Quality*, 27, pp. 166-187.
  - Lusk, L. T., Goldstein, H., Watts, K., Navarro, A., Ryder, D., (2001), "Monitoring barley lipid transfer protein levels in barley, malting and brewing", Contribuição 71 in *CD-ROM Proc. 28<sup>th</sup> Congr. Eur. Brew. Conv.*, Budapest.
-



- Marion, D., Jégou, S., Douliez, J.-P., Gaborit, T., Boivin, P., (2001), "Generation of foaming proteins along the malting and brewing processes", Contribuição 67 in *CD-ROM Proc. 28<sup>th</sup> Congr. Eur. Brew. Conv.*, Budapest.
- Mills, E. N. C., Kauffman, J. A., Morgan, M. R. A., Field, J. M., Hejgaard, J., Proudlove, M. O., Onishi, A., (1998), "Immunological study of hydrophobic polypeptides in beer", *J. Agric. Food Chem.*, 46, pp. 4475-4483.
- Mohan, S. B., Smith, L., Kemp, W., Lyddiatt, A., (1992), "An Immunochemical analysis of beer foam", *J. Inst. Brew.*, 98, pp. 187-192.
- Mohan, S. B., O'Shaughnessy, C., Shuttleworth, G., Lyddiatt, A., (1993), "Characteristics of beer proteins which affect foam stability" pp. 341-348 in *Proc. 24<sup>th</sup> Congr. Eur. Brew. Conv.*, Oslo.
- Molina-Cano, J. L., Polo, J. P., Romera, E., Araus, J. L., Zarco, J., Swanston, J. S., (2001), "Relationship between barley hordeins and malting quality in a mutant of cv. Triumph I. Genotype by environment interaction of hordein content", *J. Cereal Sci.*, 34, pp. 285-294.
- Molina-Cano, J. L., Sopena, A., Polo, J. P., Bergareche, C., Moralejo, M. A., Swanston, J. S., Glidewell, S. M., (2002a), "Relationship between barley hordeins and malting quality in a mutant of cv. Triumph. II. Genetic and environmental effects on water uptake", *J. Cereal Sci.*, 36, pp. 39-50.
- Molina-Cano, J. L., Romera, E., Aikasalo, R., Pérez-Vendrell, A. M., Larsen, J., Rubió, A., (2002b), "A reappraisal of the differences between Scandinavian and Spanish barleys: effect of  $\beta$ -glucan content and degradation on malt extract yield in the cv. Scarlett", *J. Inst. Brew.*, 108:2, pp. 221-226.
- Morrissey, J. H., (1981), "Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity", *Anal. Biochem.*, 117, pp. 307-310.
- van Nierop, S. N. E., Evans, D. E., Axcell, B. C., Cantrell, I. C., Rautenbach, M., (2004), "Impact of different wort boiling temperatures on the beer foam stabilizing properties of Lipid Transfer Protein 1", *J. Agric. Food Chem.*, 52, pp. 3120-3129.
- Nogueira, L. C., Silva, F., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Trugo, L. C., (2005), "Separation and quantification of beer carbohydrates by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection", *J. Chromatogr. A*, 1065, pp. 207-210.
- Onishi, A., Proudlove, M. O., Dickie, K., Mills, E. N. C., Kauffman, J. A., Morgan, M. R. A., (1999), "Monoclonal antibody probe for assessing beer foam stabilizing proteins", *J. Agric. Food Chem.*, 47, pp. 3044-3049.



- Osman, A. M., Coverdale, S. M., Ferguson, R., Watson, K., Fox, G., Hamilton, S. E., de Jersey, J., (2001), "What causes low barley protein modification and low wort free amino nitrogen – proteins or proteinases?", in *Proc. 10<sup>th</sup> Australian Barley Technical Symposium*, Canberra.
- Osman, A. M., Coverdale, S. M., Cole, N., Hamilton, S. E., de Jersey, J., Inkerman, P. A., (2002), "Characterization and assessment of the role of barley malt endoproteases during malt and mashing", *J. Inst. Brew.*, 108:1, pp. 62-67.
- Osman, A. M., (2003), "Barley and malt proteins and proteinases: III. A simple method for estimating the combined actions of malt proteinases and the extent of protein degradation during malting", *J. Inst. Brew.*, 109:2, pp. 150-153.
- Osman, A. M., Coverdale, S. M., Onley-Watson, K., Bell, D., Healy, P., (2003), "The gel filtration chromatographic-profiles of proteins and peptides of wort and beer: effects of processing – malting, mashing, kettle boiling, fermentation and filtering", *J. Inst. Brew.*, 109:1, pp. 41-50.
- Østergaard, O., Melchior, S., Roepstorff, P., Svensson, B., (2002), "Initial proteome analysis of mature barley seeds and malt", *Proteomics*, 2, pp. 733-739.
- Østergaard, O., Finnie, C., Laugesen, S., Roepstorff, P., (2004), "Proteome analysis of barley seeds: identification of major proteins from two-dimensional gels (pl 4-7)", *Proteomics*, 4, pp. 2437-2447.
- Peltonen, J., Rita, H., Aikasalo, R., Home, S., (1994), "Hordein and malting quality in northern barleys", *Hereditas*, 120, pp. 231-239.
- Roberts, R. T., Keeney, P. J., Wainwright, T., (1978), "The effect of lipids and related materials on beer foam", *J. Inst. Brew.*, 84, pp. 9-12.
- Ronteltap, A. D., Hollemans, M., Bisperink, C. G. J., Prins, A., (1991), "Beer foam physics", *MBAA Tech. Q.*, 28, pp. 25-32.
- Rumbo, M., Margheritis, A. I., Chirido, F. G., Giorgieri, S. A., Fossati, C. A., Añón, M. C., (2002), "Fractionation of secalins and hordeins by preparative electrophoresis at acid pH", *Eur. Food Res. Technol.*, 214, pp. 198-201.
- Schmitt, N., Gille, P., Gaucher, J., Montembault, A., (1989), "Storage proteins composition of barley seeds by RP-HPLC", pp. 187-194 in *Proc. 22nd Congr. Eur. Brew. Conv.*, Zurich.
- Sheehan, M. C., Skeritt, J. H., (1997), "Identification and characterization of beer polypeptides derived from barley hordeins", *J. Inst. Brew.*, 103, pp. 297-306.
- Shewry, P. R., Kreis, M., Parmar, S., Lew, E. J. –L., Kasarda, D. D., (1985), "Identification of  $\gamma$ -type hordeins in barley", *FEBS Lett.*, 190, pp. 61-64.

- Shewry, P. R., Halford, N. G., (2002), "Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization", *J. Exp. Bot.*, 53:370, pp. 947-958.
- Slack, P. T., Bamforth, C. W., (1983), "The fractionation of polypeptides from barley and beer by hydrophobic interaction chromatography: the influence of their hydrophobicity on foam stability", *J. Inst. Brew.*, 89, pp. 397-401.
- Sørensen, S. B., Bech, L. M., Muldbjerg, M., Beenfeldt, T., Breddam, K., (1993), "Barley Lipid Transfer Protein 1 is involved in beer foam formation", *MBAA Tech. Q.*, 30, pp. 136-145.
- Tsuchiya, Y., Araki, S., Sahara, H., Takashio, M., Koshino, S., (1995), "Identification of malting barley varieties by genome analysis", *J. Ferment. Bioeng.*, 79:5, pp. 429-432.
- Vaag, P., Bech, L. M., Cameron-Mills, V., Svendsen, I., (1999), "Characterization of a beer foam protein originating from barley", pp. 157-166 in *Proc. 27<sup>th</sup> Congr. Eur. Brew. Conv.*, Cannes.
- Villiers, O. T., Laubscher, E. W., (1989) "The use of electrophoretic techniques for the identification and determination of the malting quality of barley cultivars", pp. 203-211 in *Proc. 22<sup>nd</sup> Congr. Eur. Brew. Conv.*, Zurich.
- Wilson, R. J. H., Roberts, T. R., Smith, R. J., Bradley, L. L., Moir, M., (1999), "The inherent foam stabilising and lacing properties of some minor, hop-derived constituents of beer", in *Eur. Brew. Conv.: Symposium on Beer Foam Quality*, 27, pp. 188-205.
- Yokoi, S., Maeda, K., Xiao, R., Kamada, K., Kamimura, M., (1989), "Characterization of beer proteins responsible for the foam of beer", pp. 593-600 in *Proc. 22<sup>nd</sup> Congr. Eur. Brew. Conv.*, Zurich.

